

Université de Sherbrooke

Étude de la réactivité vasculaire chez le rat nourri au fructose, un modèle  
de résistance à l'insuline.

par

Stéphan Perron

Thèse présentée à la Faculté de médecine

En vue de l'obtention du grade de philosophiae doctor (Ph.D.) en pharmacologie

Département de Pharmacologie

Septembre 2005



Library and  
Archives Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file    Votre référence*

*ISBN: 0-494-14875-6*

*Our file    Notre référence*

*ISBN: 0-494-14875-6*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

Université de Sherbrooke  
Étude de la réactivité vasculaire chez le rat nourri au fructose, un modèle  
de résistance à l'insuline.

Stéphan Perron  
Département de Pharmacologie  
Thèse de Doctorat

La résistance à l'insuline est associée à des risques élevés de développer des complications cardiovasculaires telles l'athérosclérose, la thrombose et l'hypertension. Dans cette étude, nous avons utilisé le rat nourri au fructose, un modèle animal d'insulinorésistance non relié à l'obésité. L'étude pharmacologique de différents systèmes, en bain d'organes isolés, tels l'aorte thoracique et les carotides communes de rat nous a permis de mettre en évidence des anomalies du système vasculaire associées avec la résistance à l'insuline et l'hypertension. La relaxation induite par l'acétylcholine (ACh) dans l'aorte et les carotides ayant conservé leur endothélium a démontré une perte de réactivité chez les animaux nourris au fructose, alors que les tissus des rats contrôles conservent leur intégrité fonctionnelle. Cette perte de relaxation semble reliée au système du monoxyde d'azote (NO) puisque la relaxation au donneur de NO (SNP) sur ces mêmes préparations vasculaires n'est pas altérée. De plus, la relaxation à l'ACh dans ces vaisseaux, obtenue en présence d'inhibiteurs tel le N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine (L-NNA) et l'indométhacine (conditions reconnues pour relâcher uniquement l'endothelium-derived hyperpolarizing factor; EDHF) par l'endothélium n'est pas diminuée chez les rats nourris au fructose. Ces observations rejettent donc la possibilité d'une perte de récepteurs muscariniques et supportent celle d'une perte d'activité du système du NO. L'étude plus approfondie de la réactivité vasculaire de l'aorte et des carotides de rat a été pratiquée sur des tissus sans endothélium afin de mieux évaluer l'intégrité du muscle lisse dans le contexte pathophysiologique de la résistance à l'insuline. La relaxation directe de l'aorte obtenue avec le salbutamol, un agoniste des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques a permis d'observer une perte de relaxation chez les rats nourris au fructose, alors que la relaxation à l'adénosine ne fût pas altérée. Ces deux pharmacophores sont reconnus pour utiliser des voies de signalisation semblables et suggèrent une perte de signalisation des

récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. L'étude de la voie de signalisation empruntée par les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques en utilisant la forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase, révèle des différences entre les animaux contrôles et nourris au fructose. Ces derniers démontrent une sensibilité accrue à la forskoline. L'étude de la contraction du muscle lisse de l'aorte et de la carotide, face à l'action de différents agonistes peptidiques (angiotensine II, endothéline-1 et urotensine II) ainsi que non peptidiques (phényléphrine), n'a pas permis de mettre en évidence de différences majeures entre les tissus des rats nourris au fructose et ceux des rats contrôles. Dans la carotide cependant, nous avons observé une perte d'affinité à la phényléphrine chez les rats nourris au fructose, ce qui suggère l'existence d'une désensibilisation du système  $\alpha$ -adrénergique dans cette préparation. Les résultats de notre étude dévoilent donc que les complications cardiovasculaires associées à la résistance à l'insuline n'affectent pas seulement l'endothélium, mais aussi le muscle lisse vasculaire, comme en témoigne la perte de relaxation des vaisseaux artériels au salbutamol.

Dans un autre volet, l'étude pharmacologique de l'urotensine II sur la carotide de rat normal nous informe que cette préparation vasculaire, comme l'aorte thoracique, est sensible à ce peptide. Ceci suggère que le récepteur GPR14/UT est fonctionnel dans les vaisseaux de conductances (aorte et carotide) de rat et stimule leurs contractions, tandis qu'il est inactif ou absent dans les vaisseaux de résistance de cette espèce. Ces résultats suggèrent également que les fonctions vasculaires de l'urotensine sont limitées à quelques vaisseaux chez le rat.

Mots clefs : Résistance à l'insuline, dysfonction endothéliale, rat nourri au fructose, urotensine et récepteur  $\beta$ -adrénergique

# Table des matières

Table des matières .....	i
Liste des illustrations .....	iv
Liste des abréviations .....	vi
Introduction.....	1
1.1 La résistance à l'insuline .....	1
1.2 Anomalies associées à la résistance à l'insuline et complications cardiovasculaires.....	2
1.3 Insuline .....	5
1.3.1 Récepteur à l'insuline .....	7
1.3.2 Voies de signalisation de l'insuline .....	7
1.4 Mécanismes reliés à la résistance à l'insuline .....	11
1.5 Le système vasculaire/Complications cardiovasculaires.....	14
1.5.1 Système artériel .....	14
1.5.2 Fonctions de l'endothélium et dysfonction endothéliale.....	14
1.5.3 Découplage de la réponse vasorelaxante .....	17
1.5.3.1 Diminution de synthèse de NO.....	17
1.5.3.2 Stress Oxydatif, destruction du NO et voie métabolique associées aux complications vasculaires .....	18
1.5.4 Vasoconstricteurs.....	21
1.5.4.1 Système adrénergique.....	21
1.5.4.2 Système endothélinergique.....	23
1.5.4.3 Le système rénine-angiotensine.....	24
1.5.4.4 L'urotensine II .....	25
1.6 Modèles animaux pour l'étude de la résistance à l'insuline et du diabète.....	27
1.6.1 Le rat traité à la streptozotocine.....	27
1.6.2 Le rat Zucker et le rat corpulent de type JCR:LA .....	27
1.6.3 Le rat de sable; <i>Psammomys obesus</i> .....	28

1.6.4 Le rat nourri au fructose; diète riche en hydrate de carbone .....	29
1.7 Causes de l'insulinorésistance chez le rat nourri au fructose .....	30
1.8 Complications vasculaires retrouvées chez le rat nourri au fructose.....	31
1.8.1 Perméabilité vasculaire.....	31
1.8.2 Dysfonction endothéliale.....	31
1.8.3 Hypertension.....	32
1.8.4 Implication du système rénine-angiotensine .....	33
1.9 Hypothèse générale et objectifs spécifiques.....	35
1.9.1 Objectifs spécifiques.....	35
Matériels et Méthodes.....	37
2.1 Modèle animal : le rat nourri au fructose.....	37
2.2 Détermination des paramètres physiologiques des animaux.....	37
2.2.1 Pression artérielle.....	37
2.2.2 Prélèvement du sang.....	38
2.2.3 Évaluation de la glycémie.....	38
2.2.4 Évaluation de l'insulinémie .....	38
2.2.5 Évaluation de la triglycéridémie.....	39
2.3 Méthodologie expérimentale .....	39
2.3.1 Essais pharmacologiques <i>ex-vivo</i> .....	39
2.3.2 Évaluation de la relaxation endothélium-dépendante.....	40
2.3.3 Évaluation de la relaxation endothélium-indépendante.....	42
2.3.4 Évaluation des effets contractiles d'agonistes peptidiques et non-peptidiques .....	43
2.4 Provenance des produits utilisés.....	44
2.4.1 Solubilisation des agents pharmacologiques .....	45
2.5 Paramètres pharmacologiques-Affinité apparentes des agonistes.....	45
2.6 Évaluation statistique des données .....	46
Résultats.....	47
3.1 Paramètres physiologiques des animaux .....	47
3.2 Relaxation endothélium-dépendante de l'aorte et de la carotide.....	48
3.3 Relaxation endothélium-indépendante de l'aorte et de la carotide.....	56

3.4 Activité des agonistes kininergiques sur l'aorte et la carotide de rat .....	68
3.5 Effets contractiles des agents peptidiques et non-peptidiques.....	69
Discussion.....	80
4.1 Physiologie .....	80
4.1.1 Modèle animal .....	80
4.1.2 Hypertension.....	81
4.1.3 Réactivité vasculaire endothélium dépendante.....	81
4.1.4 Étude de la relaxation du muscle lisse vasculaire.....	85
4.2 Pharmacologie .....	90
4.2.1 Relaxation endothélium-dépendante en conditions inhibitrices/L-NNA et indométhacine.....	90
4.2.2 Réactivité des agonistes kininergiques sur l'aorte et la carotide de rat.....	94
4.2.3 Contraction du muscle lisse.....	96
4.2.3.1 Phényléphrine .....	96
4.2.3.2 Endothéline.....	96
4.2.3.3 Angiotensine II .....	98
4.2.3.4 Urotensine.....	99
4.3 Conclusion .....	101
Remerciements .....	105
Références.....	107

## Liste des illustrations

### Figures

FIGURE 1 Interrelations entre la résistance à l'insuline et ses complications.....	4
FIGURE 2 Voies de signalisation de l'insuline.....	10
FIGURE 3 Interactions entre la cellule endothéliale et le muscle lisse vasculaire dans un contexte de résistance à l'insuline. ....	16
FIGURE 4. Stress oxydatif relié aux complications de la résistance à l'insuline et du diabète. .....	20
FIGURE 5 Courbes concentration-réponses cumulatives à l'ACh sur l'aorte et les carotides de rats contrôles et nourris au fructose. ....	49
FIGURE 6 Courbes concentration-réponses cumulatives à l'ACh sur l'aorte et les carotides de rats normaux en présence d'inhibiteurs. ....	51
FIGURE 7 Tracés types de relaxation à l'ACh et au SNP sur l'aorte de rat normal.....	52
FIGURE 8 Courbes concentration-réponses cumulatives à l'ACh sur la carotide de rats normaux en présence d'inhibiteurs et de bloqueurs de canaux calciques. ....	54
FIGURE 9 Courbes concentration-réponses cumulatives à l'ACh en présence d'inhibiteur sur l'aorte et les carotides de rats contrôles et nourris au fructose. ....	55
FIGURE 10 Courbes concentration-réponses cumulatives au SNP sur l'aorte et les carotides de rats contrôles et nourris au fructose. ....	57
FIGURE 11 Courbes concentration-réponses cumulatives à l'adénosine sur l'aorte et les carotides de rats contrôles et nourris au fructose.....	58
FIGURE 12 Courbes concentration-réponses cumulatives au Salbutamol sur l'aorte et les carotides de rats contrôles et nourris au fructose.....	60
FIGURE 13 Courbes concentration-réponses cumulatives à la forskoline sur l'aorte et les carotides de rats contrôles et nourris au fructose.....	63
FIGURE 14 Courbes concentration-réponses cumulatives à l'IBMX sur l'aorte et les carotides de rats contrôles et nourris au fructose.....	64



FIGURE 15 Courbes concentration-réponses cumulatives au Pinacidil sur l'aorte et les carotides de rats contrôles et nourris au fructose.....	66
FIGURE 16 Courbes concentration-réponses cumulatives à l'U-II sur l'aorte et les carotides de rats contrôles et nourris au fructose. ....	70
FIGURE 17 Courbes concentration-réponses cumulatives à la phényléphrine sur l'aorte et les carotides de rats contrôles et nourris au fructose.....	71
FIGURE 18 Courbes concentration-réponses cumulatives à l'ET-1 sur l'aorte et les carotides de rats contrôles et nourris au fructose. ....	73
FIGURE 19 Courbes concentration-réponses cumulatives à l'AngII sur l'aorte et les carotides de rats contrôles et nourris au fructose.....	76
FIGURE 20 Courbes concentration-réponses cumulatives des agents contractiles sur l'aorte et les carotides de rats normaux.....	78
FIGURE 21 Schéma intégratif des résultats pharmacologiques obtenus dans notre étude. .	102

## Tableaux

TABEAU 1 Actions de l'insuline sur les tissus sensibles.....	6
TABEAU 2 Paramètres physiologiques des animaux.....	48
TABEAU 3 Tableau récapitulatif des paramètres pharmacologiques des agents relaxants	67
TABEAU 4 Tableau récapitulatif de l'effet des kinines et leurs analogues. ....	68
TABEAU 5 Tableau récapitulatif des paramètres pharmacologiques des agents contractiles. ....	77
TABEAU 6 Tableau comparatif de l'ordre d'affinité et d'effet maximal des différents agonistes contractiles. ....	79

## Liste des abréviations

ACh .....	Acétylcholine
AngII .....	Angiotensine II
APS .....	Adapter protein containing a PH and SH2 domain
BK .....	Bradykinine
BK <sub>Ca</sub> .....	Canaux potassiques à large conductance activés par le calcium
c-Cbl .....	Oncogène p120 <sup>cbl</sup>
DAG .....	Diacyl glycérol
EDCF .....	Endothelium-derived contracting factor
EDHF .....	Endothelium-derived hyperpolarizing factor
EDRF .....	Endothelium-derived relaxing factor
ET-1 .....	Endothéline 1-21
GAB .....	Grb2-associated binder-1
IBMX .....	3-isobutyl-1-methylxanthine (inhibiteur des phosphodiésterases)
IK <sub>Ca</sub> .....	Canaux potassiques à conductance intermédiaire activés par le calcium
IRS .....	Insulin Receptor Substrate
IP <sub>3</sub> .....	1,4,5-Inositol-triphosphate
HDL .....	Lipoprotéine à haute densité (High-density lipoprotein)
L-NNA .....	N <sub>G</sub> -nitro-L-arginine (inhibiteur de NOS)
NO .....	Monoxyde d'azote
NOS .....	Monoxyde d'azote synthétase
p60 <sup>DOK</sup> .....	62-kDa RasGAP downstream of kinase
Shc .....	Src homology/collagen; P <sup>52</sup>
SK <sub>Ca</sub> .....	Canaux potassiques à petite conductance activés par le calcium
SNP .....	Nitroprussiate de sodium (donneur de NO)
SIRPS .....	Signal-regulatory proteins
Uro II .....	Urotensine II

# Introduction

On estime à 250 millions le nombre de personnes affectées par le diabète dans le monde (ALPER, 2000). Au Canada, on estime que 4.5% des gens âgés de 18 ans et plus sont atteints de la maladie, soit environ 1,1 million de personnes. Cette maladie est la cause principale de cécité, d'insuffisance rénale et d'amputation de membres chez l'adulte. La maladie apparaît sous deux formes : le diabète insulino-dépendant (type 1) et le diabète non-insulino-dépendant (type 2). Le diabète de type 1 résulte d'une destruction des cellules  $\beta$  du pancréas menant à une insulino-pénie, alors que le diabète de type 2 est caractérisé par une résistance périphérique et hépatique à l'action de l'insuline (KAHN, 1997) et suivie d'une réduction de sécrétion d'insuline. Dans les deux cas, un risque plus élevé de développer des maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose, la thrombose et l'hypertension est observé (SOWERS *et al.*, 1993; JOKL et COLWELL, 1997).

## 1.1 La résistance à l'insuline

Le concept de résistance à l'insuline fut introduit au début des années 40. C'est à cette époque que l'on évoqua la possibilité pour la première fois que l'hyperglycémie des patients diabétiques pouvait être causée par une résistance à l'action de l'insuline et non pas par une carence en insuline (HIMSWORTH et KERR, 1939). Cette hypothèse fut validée en 1960 alors qu'on rapportait que les gens atteints de diabète type 2 étaient hyperinsulinémiques (YALOW et BERSON, 1960). D'autres évidences démontrant que l'organisme entier était résistant à l'insuline chez les patients diabétiques type 2 ont ensuite été apportées. Les observations faites par Alford et collaborateurs, montrant une plus faible diminution du glucose sanguin en réponse à l'infusion d'insuline chez certains patients diabétiques adultes, ajoutaient plus de précisions sur la maladie (ALFORD *et al.*, 1970). L'évolution constante des techniques permettant d'évaluer l'action de l'insuline *in vivo* a par la suite permis

d'accroître les connaissances sur ce désordre métabolique. À la fin des années 70, la technique de clamp (glucose/insuline) fut introduite comme un outil pouvant évaluer la sensibilité de l'insuline *in vivo* et révéler la résistance d'un organisme à l'insuline. Cette technique a permis de quantifier l'action de l'insuline sur un organisme en fixant la glycémie d'une personne et calculer la quantité d'insuline requise pour maintenir celle-ci à un niveau constant (DEFRONZO *et al.*, 1979). Il fut alors démontré que l'habileté de l'insuline à stimuler le transport du glucose dans les cellules était affectée chez les patients atteints de diabète type 2 (REAVEN, 1983).

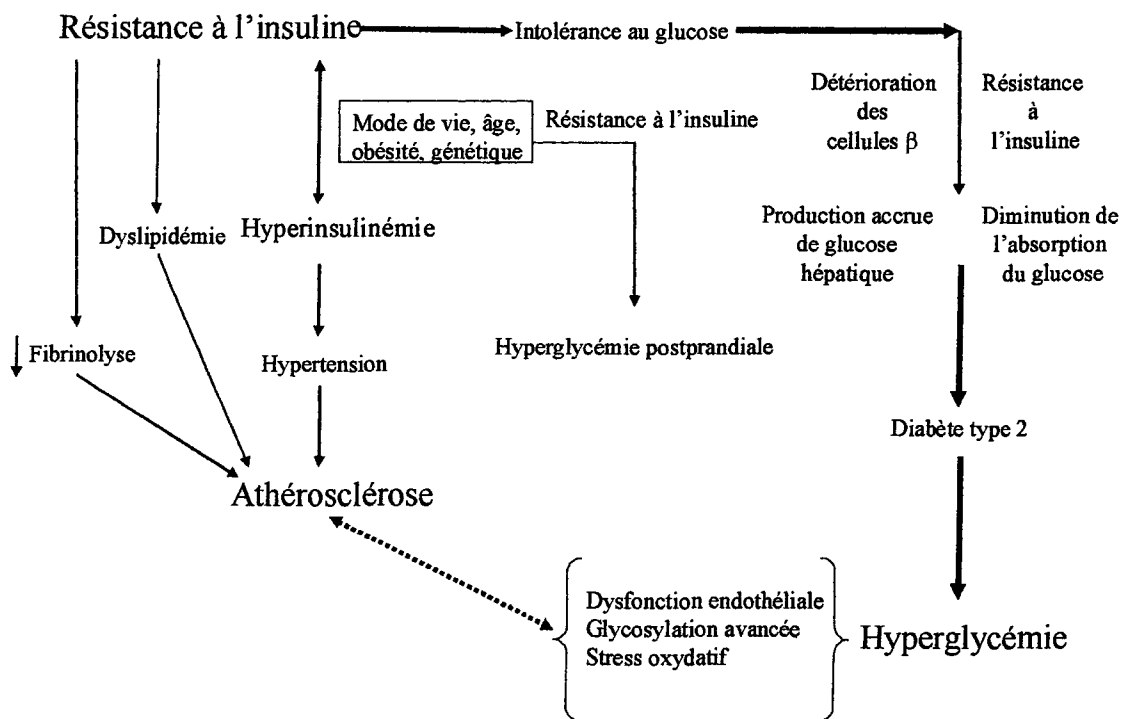
La résistance à l'insuline se traduit comme un état de réponse réduite aux concentrations circulantes d'insuline. Cette résistance est reconnue comme un facteur majeur impliqué dans la pathogenèse du diabète de type 2 (REAVEN, 1995). Elle est associée avec l'âge, des facteurs environnementaux (e.g. alimentation, mode de vie) mais surtout un terrain génétique propice. En plus d'être impliquée dans le diabète de type 2, la résistance à l'insuline est impliquée dans des altérations du métabolisme des lipides et de la réactivité vasculaire (REAVEN, 1988). Ces désordres s'ajoutent aux facteurs qui contribuent au développement des complications associées aux états d'insulinorésistance.

## **1.2 Anomalies associées à la résistance à l'insuline et complications cardiovasculaires**

Même si le diabète ou l'hyperglycémie ne se développent pas chez tous les individus résistants à l'insuline, l'insulinorésistance n'en demeure pas moins un élément important dans le développement de complications chez l'homme. La glycémie peut en effet être maintenue par une hyperinsulinémie compensatrice. Cet état hyperinsulinémique/insulinorésistant, peut mener à plusieurs désordres tels une élévation des triglycérides plasmatiques, une baisse de HDL, des anomalies de la fibrinolyse, une résistance vasculaire élevée, des changements dans les taux de certaines hormones stéroïdiennes et un gain pondéral (SOWERS *et al.*, 1993; GINSBERG, 2000). Ainsi, la résistance à l'insuline est fréquemment associée à l'obésité, au syndrome des ovaires polykystiques, à la dyslipidémie, à l'hypercoagulation, à l'athérosclérose et à l'hypertension

artérielle (CHEN et REAVEN, 1997). Cette panoplie de maladies a été regroupée sous l'appellation de "Syndrome X", syndrome de résistance à l'insuline ou de syndrome plurimétabolique.

La résistance à l'insuline n'est donc pas un simple problème caractérisé par une difficulté à réduire la glycémie efficacement. Elle se manifeste plutôt comme un syndrome complexe qui augmente significativement les risques de complications cardiovasculaires (HAMATY *et al.*, 1998). Bien que les preuves associant l'insulinorésistance aux complications cardiovasculaires existent sur le plan épidémiologique, les bases mécanistiques du phénomène restent encore relativement mal comprises. Plusieurs concepts pathophysiologiques ont été mis de l'avant pour expliquer l'association de la résistance à l'insuline à l'hypertension artérielle. On rapporte que 50% des hypertendus sont résistants à l'insuline (GINSBERG, 2000). Il a été suggéré qu'un défaut dans la vasodilatation des vaisseaux sanguins soit le lien entre l'hypertension et la résistance à l'insuline (BARON *et al.*, 1993; STEINBERG *et al.*, 1996). D'autres concepts ont été postulés pour expliquer ce phénomène, entre autres l'augmentation de la réabsorption sodique par le rein (DEFRONZO, 1981), l'activation du système nerveux autonome (ROWE *et al.*, 1981) et l'augmentation de la réactivité vasculaire (SOWERS *et al.*, 1993). Ceci n'explique cependant pas toutes les subtilités des liens complexes existants entre l'insulinorésistance et l'hypertension artérielle. Avec la présence de la résistance à l'insuline, on doit également tenir compte de facteurs physiologiques supplémentaires tels l'hyperinsulinémie et l'hyperglycémie. Ces deux éléments peuvent aussi contribuer à alourdir le bilan de santé chez les personnes résistantes à l'insuline et compliquer davantage la relation entre l'insulinorésistance et l'hypertension comme en témoigne la figure 1.



**FIGURE 1 Interrelations entre la résistance à l'insuline et ses complications.**

Adapté de SOWERS *et al.*, 1993 et de TURNER et CLAPHAM, 1998.

Nous allons maintenant décrire brièvement le système de l'insuline (hormone, récepteur et voie de signalisation) pour mieux comprendre la complexité de la résistance à l'insuline et faire un survol des évidences retrouvées dans la littérature pour expliquer le syndrome plurimétabolique.

### 1.3 Insuline

L'insuline est produite, entreposée et sécrétée par les cellules  $\beta$  du pancréas. Lorsque la glycémie augmente dans la circulation sanguine, l'insuline est relâchée par les cellules pancréatiques qui rétablissent l'homéostasie. La biosynthèse et la sécrétion de l'insuline sont hautement régulées afin d'offrir un échange dynamique entre l'environnement et les cellules  $\beta$  de manière à ce que les cellules puissent constamment fournir l'hormone.

La synthèse de l'insuline se fait en plusieurs étapes. Tout d'abord, elle est synthétisée sous forme d'un précurseur, la préproinsuline. Cette protéine comprend un peptide signal, la chaîne B, le peptide C et la chaîne A (CHAN *et al.*, 1976). Le peptide signal est rapidement enlevé au niveau du réticulum endoplasmique pour générer la proinsuline. La proinsuline est ensuite maturée au niveau du trans-Golgi pour devenir l'insuline.

Lors du stimulus qui activera la relâche des granules de sécrétion contenant l'insuline, le relargage dans la circulation comprendra également le peptide C, la proinsuline ainsi que les intermédiaires de la maturation de l'insuline. L'activité biologique de l'insuline est beaucoup plus grande que celle de la proinsuline (BERGENSTAL *et al.*, 1985) ou les intermédiaires de la maturation de l'insuline (PEAVY *et al.*, 1985). Chez les personnes souffrant de résistance à l'insuline, on rapporte une augmentation des intermédiaires de maturation de l'insuline dans le sérum (SAAD *et al.*, 1990). Le peptide C n'est pas un métabolite actif (POLONSKY et RUBENSTEIN, 1984) mais il est cependant sécrété de façon équimolaire à l'insuline, ce qui en fait un bon marqueur de la sécrétion d'insuline. Le peptide C a néanmoins été montré comme modulant l'action de l'insuline mais son rôle reste encore mal défini (IDO *et al.*, 1997).

De par son action sur les hydrates de carbone, les protéines et le métabolisme des lipides, l'insuline exerce des effets métaboliques importants. Cette protéine est reconnue comme l'hormone favorisant surtout l'utilisation et l'entreposage des nutriments. Cet effet régulateur de glucose se fait surtout sur les tissus sensibles à l'insuline comme le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux. Dans le foie, l'action de l'insuline inhibe la néoglucogenèse et la glycogénolyse tout en favorisant la glycogénèse. Dans le muscle strié et le tissu adipeux, elle stimule la captation, l'utilisation et l'entreposage du glucose. Les actions de l'insuline sont nombreuses et touchent plusieurs tissus. Ces actions endocrines sont résumées au Tableau 1. En plus de l'effet direct sur le métabolisme du glucose et des lipides, l'insuline affecte l'expression de plusieurs gènes d'importance impliqués dans ces mécanismes (O'BRIEN et GRANNER, 1996). L'insuline peut également avoir un effet sur le transport des ions. En effet, l'insuline est reconnue comme une hormone régulatrice de la pompe  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase et de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SOWERS *et al.*, 1993).

Actions directes de l'insuline			
	Foie	Tissu adipeux	Muscles
Captation du glucose	+	+	+
Glycogénèse	+		+
Régulation de pompe ionique* ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) ATPase			+
Synthèse protéique*	+	+	+
Régulation d'expression génique*	+	+	+
Captation d'acides aminés*	+	+	+
Production d'acide gras	+		

**TABLEAU 1 Actions de l'insuline sur les tissus sensibles.**

\*Action observable chez plusieurs autres types cellulaires. (MOLLER et FLIER, 1991)



### 1.3.1 Récepteur à l'insuline

Le récepteur à l'insuline est une glycoprotéine transmembranaire de 460 kDa. Le gène du récepteur à l'insuline localisé sur le bras court du chromosome 19, chez l'humain, contient 22 exons et code pour un ADNc de 4.2 Kb. La structure mature du récepteur est un hétérotétramère composé de deux sous-unités  $\alpha$  de 135 kDa et de deux sous-unités  $\beta$  de 95 kDa reliées entre elles par des ponts disulfures. La sous-unité  $\alpha$  est entièrement extracellulaire alors que la sous-unité  $\beta$  possède un domaine transmembranaire d'une vingtaine d'acides aminés. Chaque sous-unité est une glycoprotéine possédant plusieurs sites de glycosylation (O et N) qui sont utiles entre autre pour la liaison à l'insuline. Le récepteur possède une activité tyrosine kinase intrinsèque qui est responsable de la propagation du signal à l'intérieur de la cellule (WHITE et KAHN, 1994). Cette activité tyrosine kinase s'effectue sur le récepteur lui-même (autophosphorylation) et sur de multiples substrats intracellulaires d'importance. Les deux sous-unités du récepteur exercent différentes fonctions nécessaires à la transmission du signal vers l'intérieur de la cellule. La sous-unité  $\alpha$  lie l'insuline avec une haute affinité et une grande spécificité. Lorsque les sous-unités  $\alpha$  du récepteur ne sont pas liées à l'insuline, ces dernières inhibent l'activité tyrosine kinase des sous-unités  $\beta$ . La sous-unité  $\beta$  du récepteur à l'insuline contient plusieurs régions fonctionnelles incluant un domaine de liaison à l'ATP, une région juxta membranaire du côté cytoplasmique, une région régulatrice et une région terminale COOH. Une fois activée, la sous-unité  $\beta$  propage le signal en phosphorylant différents résidus tyrosines sur des protéines cytosoliques comme les IRS (Insulin Receptor Substrate), GAB-1 (Grb2-associated binder-1), Shc (Src homology/collagen; P<sup>52</sup>), APS (adapter protein containing a PH and SH2 domain), p60<sup>DOK</sup> (62-kDa RasGAP downstream of kinase), SIRPS (signal-regulatory proteins) et c-Cbl (p120<sup>cbl</sup>) (SALTIEL et PESSIN, 2002).

### 1.3.2 Voies de signalisation de l'insuline

Il y a des évidences qui suggèrent que différents résidus tyrosines sont impliqués dans des fonctions précises du récepteur. Par exemple, la phosphorylation des tyrosines du côté C-

terminal assure les fonctions mitogéniques de l'insuline. La phosphorylation des résidus tyrosines au niveau du domaine juxta membranaire participe à la liaison des substrats alors que ceux dans les domaines catalytiques régulent l'activité des sous-unités  $\beta$  du récepteur (KAHN, 1997). Suite à l'activation des kinases du récepteur à l'insuline, plusieurs protéines cytoplasmiques peuvent servir de substrats. La famille de protéines IRS est cependant très importante dans la voie de signalisation de l'insuline. L'IRS-1 est l'isoforme la mieux caractérisée. Elle possède 21 sites potentiels de phosphorylation ayant comme motif YMXM, YXXM ou même d'autres sites hydrophobes (WHITE, 1998). L'IRS-1 peut également être phosphorylé sur des résidus sérine/thréonine selon des motifs variés et ce, par une variété de kinases. Plusieurs fonctions physiologiques ont été attribuées à IRS1 et IRS2. L'utilisation de souris knock-out IRS1 et IRS2 a été très utile pour valider le rôle de ces protéines dans la voie de signalisation de l'insuline, mais aussi pour vérifier si celles-ci avaient un rôle d'importance dans la résistance à l'insuline. Les souris homozygotes IRS1 knock-out développent une légère résistance à l'insuline qui ne mène pas au diabète de type 2. Ceci serait présumément attribuable à l'action compensatoire des cellules  $\beta$  (ARAKI *et al.*, 1994). L'invalidation génétique du gène IRS2 mène à l'apparition de la résistance périphérique à l'insuline, au découplage de la sécrétion d'insuline et au diabète (WITHERS *et al.*, 1998). Des études plus poussées avec ce modèle animal ont permis d'observer que le transport du glucose était encore actif au niveau du muscle squelettique et que la résistance à l'insuline serait plutôt un mal fonctionnement des cellules  $\beta$  (HIGAKI *et al.*, 1999). En effet, la résistance à l'insuline et l'aboutissement au diabète chez les souris IRS2 knock-out, seraient intimement liés aux altérations dans la sécrétion de l'insuline (KULKARNI *et al.*, 1999).

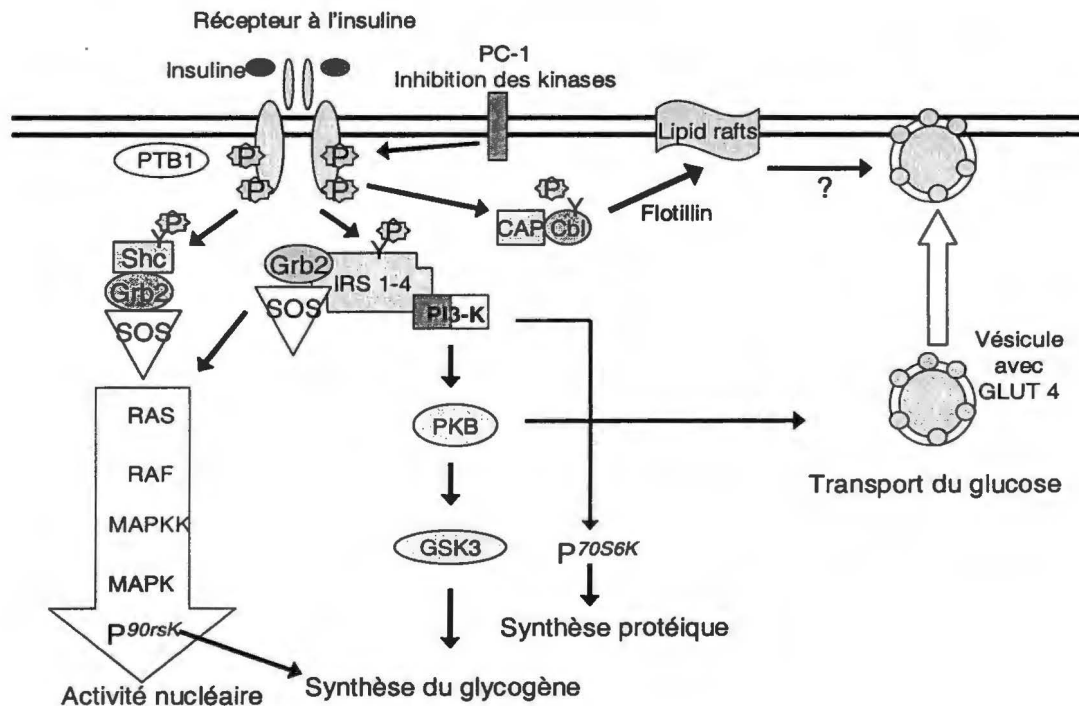
Les sites de phosphorylation sur les IRS donnent plusieurs possibilités de liaison à des protéines contenant des domaines SH2 (Src homology-2) comme la phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) et la phosphotyrosine phosphatase SH-P-TP2 (Syp; WHITE et KAHN, 1994). La phosphorylation d'IRS-1 fait partie de la deuxième étape dans la voie de signalisation de l'insuline. Cette protéine assure une divergence rapide du signal de transduction vers plusieurs voies métaboliques. La liaison de la PI 3-kinase à IRS-1 mène à

une rapide stimulation de l'activité enzymatique. Cette enzyme est composée de 2 sous-unités : une sous-unité régulatrice (p85) et une sous-unité catalytique (p110). La sous-unité p85 contient les domaines SH2 qui permettront l'ancrage à IRS-1. Cette architecture stimulera l'activité enzymatique de la PI 3-kinase, c'est à dire catalysera la phosphorylation des phosphatidylinositols. Cette dernière étape est importante pour l'activation de la protéine kinase B (Akt) et la propagation du signal pour la translocation des GLUT4 à la membrane plasmique. La voie de signalisation de PI 3-kinase peut également activer des enzymes impliqués dans la synthèse protéique dont pp70 S6 kinase (KAHN, 1997). Le signal de transduction de PI 3-kinase expliquerait en partie les effets hypoglycémiants et anabolisants de l'insuline.

D'autres protéines SH2 liant IRS-1 ne possèdent cependant pas d'activité enzymatique et servent plutôt de protéines adaptatrices entre IRS-1 et d'autre système de signalisation. GRB2 est une de ces protéines qui est le mieux caractérisées. Elle crée un lien entre l'insuline et la voie de signalisation de Ras (p21<sup>ras</sup>). GRB2 entre en interaction avec SOS, une protéine qui échange des nucléotides guanines. Le complexe GRB2/SOS permettra l'activation de Ras qui, chargée de GTP, sera activée. L'activation de Ras aura pour effet de déclencher une cascade de phosphorylation qui impliquera Raf-1 kinase, MAP kinase kinase, MAP kinase et p90 S6 kinase et qui se terminera par la phosphorylation de plusieurs facteurs de transcription régulant l'expression de gènes (WHITE et KAHN, 1994). La phosphorylation et l'activation de p90 S6 kinase peut également activer des enzymes impliquées dans la synthèse du glycogène.

La translocation des GLUT4 à la membrane plasmique est essentielle à l'entrée du glucose dans le muscle et les adipocytes. Comme mentionné plus haut, la voie de signalisation de PI 3-kinase est impliquée dans le trafic des GLUT4. L'action de PI 3-kinase a été cependant défini comme étant insuffisante à produire une translocation complète des GLUT4 à la membrane (WIESE *et al.*, 1995). L'étude plus approfondie des voies de signalisation de l'insuline a permis de découvrir de nouveaux substrats pour le récepteur à l'insuline. Cbl, le produit d'un protooncogène, a été récemment reconnu comme un de ces substrats. Cette

protéine entre en contact avec le récepteur à l'insuline grâce à une protéine adaptatrice appelée CAP (PESSIN et SALTIEL, 2000). Suite à la phosphorylation de Cbl, le complexe CAP-Cbl se dissocie du récepteur à l'insuline et migre vers les membranes riches en cavéolines (MASTICK *et al.*, 1995). Il est ensuite redirigé vers les radeaux lipidiques (lipid rafts) lorsque la flotilline, une protéine cavéolaire, s'ajoute au complexe. Le blocage de la migration du complexe CAP-Cbl aux radeaux lipidiques inhibe la stimulation de la translocation des GLUT4 et la prise du glucose. La localisation du complexe CAP-Cbl semble donc un événement parallèle aux voies classiques pour activer la captation du glucose par les cellules (BAUMANN *et al.*, 2000). Une récente étude a cependant démontrée que



**FIGURE 2** Voies de signalisation de l'insuline.

Adapté de B. B. Zhang ([www.Endotexte.com](http://www.Endotexte.com)).

cette voie de signalisation n'est pas aussi importante dans l'initiation de la translocation des GLUT 4 à la membrane plasmique par l'insuline (MITRA *et al.*, 2004). Cette description non exhaustive des voies de signalisation de l'insuline démontre la grande diversité des cibles pouvant mener à la résistance à l'insuline. Voici donc quelques informations sur ces mécanismes potentiellement importants sur le plan physiopathologique.

#### **1.4 Mécanismes reliés à la résistance à l'insuline**

Le récepteur à l'insuline est lui-même impliqué dans certains cas de résistance à l'insuline. Plusieurs raisons peuvent relier ce dernier à l'insulinorésistance; que ce soit le niveau d'expression du récepteur, l'affinité que peut avoir l'insuline pour celui-ci ou encore le niveau de phosphorylation ou l'activité kinase. Toutes ces raisons sont valables et peuvent mener à un phénotype de résistance à l'insuline. Cependant, les individus chez qui nous observons un défaut génétique au niveau du récepteur montrent une résistance sévère à l'insuline qui se manifeste cliniquement par des syndromes tel que le syndrome type A, le lepréchaunisme et le syndrome Rabson-Mendenhall (MOLLER et FLIER, 1991). Toutes ces maladies sont cependant rares et n'expliquent qu'un faible pourcentage des cas de résistance à l'insuline vus en clinique. La phosphorylation du récepteur à l'insuline peut mener également à une résistance à l'insuline. En effet, il a été observé dans des études *in vitro*, que la phosphorylation des résidus sérines et thréonines de la sous-unité  $\beta$  diminuait son activité kinase (ODAWARA *et al.*, 1989). L'hyperinsulinémie chronique causée par la résistance à l'insuline peut stimuler l'activation de sérine et/ou thréonine kinase via le récepteur de l'IGF-1 par exemple, qui peut lui-même être activé par de fortes concentrations d'insuline (ZENG et QUON, 1996). Les cytokines (e.g.  $\text{TNF}\alpha$ ) peuvent également activer des sérine kinases telles que les protéines kinases C (PKC) qui sont reconnues pour être impliquées dans le développement de la résistance à l'insuline périphérique. Plusieurs isoformes de PKC sont activées chez l'homme ou dans des modèles animaux de résistance l'insuline chez les rongeurs (CONSIDINE *et al.*, 1995). Ces kinases peuvent catalyser la phosphorylation des résidus sérines/thréonines du récepteur ou d'autres protéines impliquées dans la voie

signalisation de l'insuline. L'inhibition des PKC par des agents pharmacologiques pourrait augmenter la sensibilité à l'insuline et améliorer les paramètres physiologiques des patients diabétiques (ISHII *et al.*, 1996). Comme nous l'avons soulevé plus tôt dans l'introduction, l'initiation du signal de l'insuline et sa transmission nécessitent un équilibre entre la phosphorylation et la déphosphorylation de résidus sur différentes protéines intracellulaires. Bien que la phosphorylation du récepteur soit essentielle à la propagation du signal, elle peut cependant aussi l'inactiver comme nous venons de le mentionner. Un équilibre précaire s'installe donc entre la phosphorylation et la déphosphorylation des différentes composantes de cette chaîne. Cet équilibre peut être brisé si les tyrosines phosphatases (PTPase) impliquées n'agissent pas adéquatement. Une déphosphorylation prématurée du récepteur à l'insuline peut donc mener à l'inactivité des kinases et à une atténuation du signal de l'insuline. Deux PTPases sont impliquées dans la régulation négative du récepteur à l'insuline; la PTP1B et le LAR (GOLSTEIN *et al.*, 1998; DRAKE *et al.*, 1998). Une surexpression de ces phosphatases a été rapportée chez les patients résistants à l'insuline (PESSIN et SALTIEL; 2000). L'importance de ces phosphatases dans la signalisation de l'insuline ainsi que dans la résistance à l'insuline a également été appuyée par des études *in vitro*. En effet, la surexpression de ces enzymes diminue la signalisation de l'insuline (PESSIN et SALTIEL, 2000). Récemment, l'utilisation d'un modèle avec invalidation génétique au niveau du gène de la PTP1B a permis de démontrer une augmentation de la sensibilité à l'insuline appuyant ainsi le rôle important de ces protéines dans cette voie de signalisation de l'insuline (ELCHEBLY *et al.*; 1999). PTP1B est donc une cible thérapeutique intéressante pour le traitement de la résistance à l'insuline.

D'autres explications de la résistance à l'insuline proviennent de l'observation de mécanismes d'interférence dans la voie de signalisation à l'insuline. De tels mécanismes impliquent l' $\alpha$ -2-HS-glycoprotéine (SRINIVAS *et al.*, 1996) et PC-1 (MADDUX *et al.*, 1995). Ces deux protéines agissent comme des inhibiteurs des tyrosines kinases du récepteur à l'insuline et diminuent la signalisation menant à la réponse mitogénique alors que la signalisation des activités métaboliques demeure fonctionnelle (SRINIVAS *et al.*, 1996).  $\alpha$ -2-HS-glycoprotéine est produite par le foie et relâchée dans la circulation alors que PC-1 est

une glycoprotéine membranaire qui peut interagir avec le récepteur à l'insuline (KAHN, 1997). De plus, on rapporte que les niveaux de cette dernière sont plus élevés chez les patients souffrant de résistance à l'insuline suggérant ainsi un rôle possible dans la pathogenèse de la résistance à l'insuline (GOLDFINE *et al.*, 1999).

Des études récentes rapportent que la résistance à l'insuline associée avec l'obésité semble impliquer la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B dans le développement de cette pathologie (KIM *et al.*, 2001, YUAN *et al.*, 2001). Ces études dévoilent que l'inhibition de cette voie de signalisation par les salicylates ou par l'invalidation génétique améliore la sensibilité à l'insuline *in vivo*. D'autres évidences démontrent que ce désordre métabolique associé avec l'obésité serait lié à l'expression de iNOS et à la libération de NO (BÉDARD *et al.*, 1997; KAPUR *et al.*, 1997). Le mécanisme par lequel iNOS cause la résistance à l'insuline est encore mal compris. La démonstration de l'implication de ce mécanisme dans la résistance à l'insuline a été récemment dévoilée au niveau du muscle squelettique (PERREAULT et MARETTE, 2001). L'effet protecteur par l'invalidation génétique du gène de la iNOS suggère un rôle important dans la pathogenèse de la résistance à l'insuline. Malgré ces importants travaux, il faudra d'autres études pour clarifier le rôle de iNOS et son implication dans le développement de la résistance à l'insuline. Des travaux plus étendus sur l'implication de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B seront également nécessaires pour comprendre son implication et les mécanismes qui sous-tendent l'effet protecteur. Ces deux éléments demeurent néanmoins des avenues intéressantes et novatrices pour l'élaboration de nouvelles thérapies pour pallier l'insulinorésistance.

## **1.5 Complications cardiovasculaires**

### **1.5.1 Système artériel**

Les vaisseaux artériels de gros calibre (artère), comme l'aorte et la carotide, sont des vaisseaux de distribution (ou de conductance) avec une paroi élastique ayant un large diamètre et une faible résistance. Leur but principal est de transporter le sang vers la périphérie et les divers organes. Ce type d'artère est formée de trois couches soit : l'adventice, la media (muscle lisse) et l'intima (endothélium). L'intima forme une barrière mécanique composée d'une monocouche de cellules, l'endothélium. Les artères se ramifient à l'intérieur de chaque organe en une série de vaisseaux plus petits, les artérioles, vaisseaux constitués d'une couche de cellules endothéliales et de muscle lisse assez étroits pour opposer une résistance considérable. Elles constituent le site majeur de résistance dans l'arbre vasculaire et assurent un débit sanguin optimal vers les lits capillaires (GUYTON, 1981). Ils ont donc une importance majeure dans la régulation de la pression artérielle. On reconnaît également que les artères de conductance, sous l'effet d'une régulation endothéliale propre, peuvent avoir un rôle à jouer dans la variation des flux et de pressions.

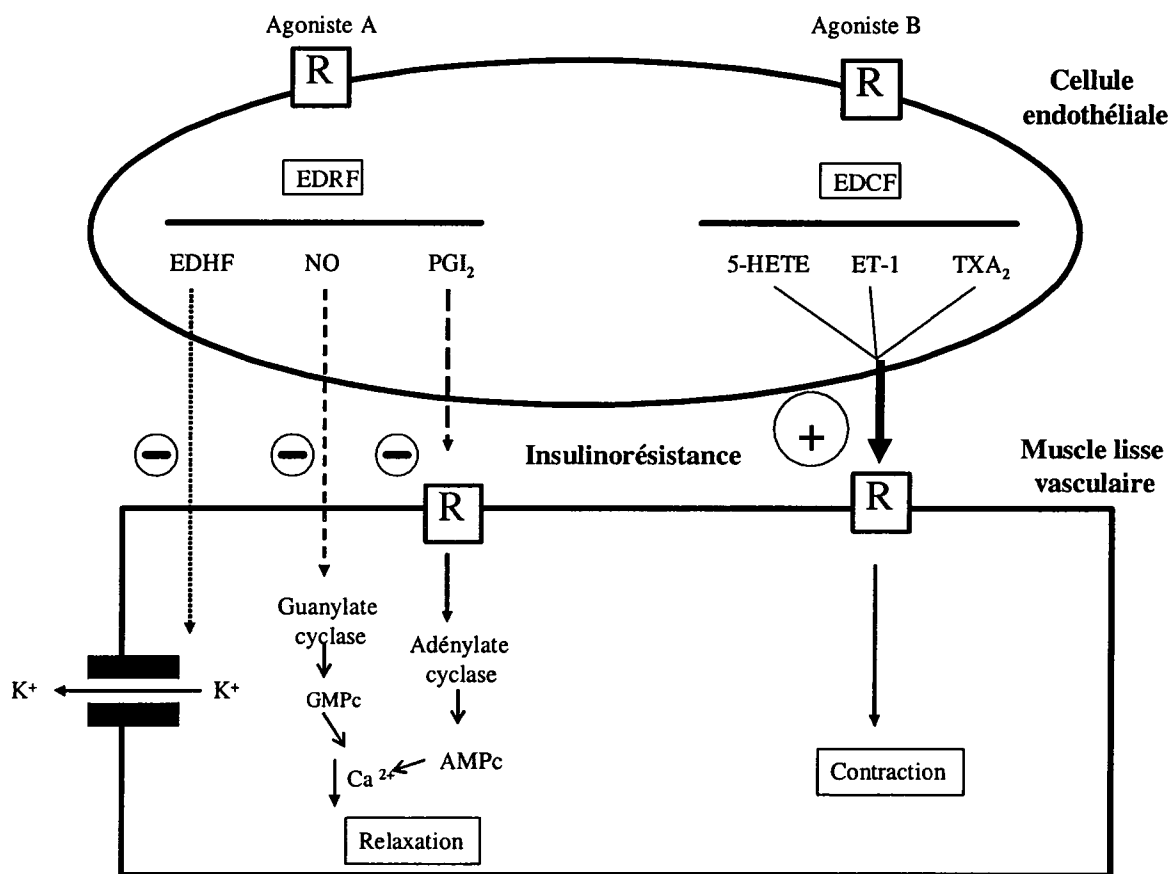
Au centre du bon fonctionnement du système vasculaire, nous retrouvons la cellule endothéliale (VANHOUTTE, 1989). Dans la prochaine partie nous allons décrire le rôle de la cellule endothéliale dans la physiologie vasculaire ainsi que son implication dans les complications vasculaires.

### **1.5.2 Fonctions de l'endothélium et dysfonction endothéliale**

Comme nous l'avons souligné en début d'introduction, la résistance à l'insuline prédispose l'organisme à développer des complications vasculaires. La relation intime qu'entretiennent l'endothélium et le muscle lisse vasculaire donne lieu à un chassé-croisé complexe pour arriver à un équilibre entre l'action des vasorelaxants et celles des vasoconstricteurs. Cet équilibre assure le bon fonctionnement des vaisseaux sanguins et garde la pression artérielle



au niveau physiologique normal. L'endothélium est impliqué dans plusieurs mécanismes physiologiques tels l'hémostase (coagulation plasmatique et fibrinolyse), le tonus vasculaire, la perméabilité vasculaire et l'angiogenèse (VANHOUTTE, 1989). Elle est aussi capable de générer une variété de vasodilatateurs tels le monoxyde d'azote (NO/EDRF, IGNARRO *et al.*, 1987), la prostacycline (PGI<sub>2</sub>, MONCADA et VANE, 1979) et le facteur hyperpolarisant dépendant de l'endothélium (EDHF, GARLAND *et al.*, 1995). Elle produit également des vasoconstricteurs (EDCF) comme les endothélines, les prostanoïdes, les métabolites de l'acide arachidonique (5-HETE, TXA<sub>2</sub>) et les anions superoxyde (FURCHGOTT et VANHOUTTE, 1989; Figure 3). Une altération des ces fonctions causée par des changements métaboliques (e.g. hyperinsulinémie, hyperglycémie) peuvent potentiellement mener à des changements de la réactivité vasculaire (SCHRÖR, 1997; van OOSTROM *et al.*, 2002). La conséquence la plus commune, associée au diabète et à l'insulinorésistance, est le découplage de la relâche d'agents vasorelaxants (e.g. NO, PGI<sub>2</sub>, EDHF) par la cellule endothéliale appelé dysfonction endothéliale (DE VRIESE *et al.*, 2000), qui s'exprime souvent par une diminution de la relâche des vasorelaxants endothéliaux ou par une diminution de leurs actions biologiques (VANHOUTTE, 1998). Chez le patient diabétique/insulinorésistant, la détérioration de l'endothélium vasculaire semble en effet un événement critique dans le développement de la vasculopathie et ce, tant au niveau de la micro- que de la macrocirculation (HONING *et al.*, 1999; van OOSTROM *et al.*, 2002).



**FIGURE 3 Interactions entre la cellule endothéliale et le muscle lisse vasculaire dans un contexte de résistance à l'insuline.** Les signes négatifs indiquent une diminution alors que le signe positif signale une augmentation de la libération de facteurs endothéliaux.

R, récepteur, EDRF, endothelium-derived relaxing factor; EDHF endothelium-derived hyperpolarizing factor; EDCF, endothelium-derived contracting factor; 5-HETE, acide 5-hydroxyeicosatétraénoïque; TXA<sub>2</sub>, tromboxane A<sub>2</sub>; PGI<sub>2</sub>, prostacycline; ET-1, endothéline-1.

Adapté de De Vriese *et al.*, 2000.

Bien que les résultats des études réalisées chez l'homme ne fassent pas l'objet d'un consensus, plusieurs chercheurs rapportent des altérations au niveau du système vasculaire. En effet, des études, chez des patients diabétiques, à l'aide de la technique de «flow-mediated dilation» (FMD; plethysmographie), démontrent un découplage de la relâche de NO endothélium-dépendant alors que la réponse à des donneurs de NO exogènes demeure normale (JOHNSTONE *et al.*, 1993; TING *et al.*, 1996; WILLIAMS *et al.*, 1996). D'autres chercheurs observent cependant une perte de réactivité endothélium-dépendante et indépendante (McVEIGH *et al.*, 1992; WATTS *et al.*, 1996) alors que d'autres n'observent aucune perte de réactivité vasculaire (AVOGARO *et al.*, 1997). L'hétérogénéité de ces résultats peut provenir des patients utilisés pour l'étude. Le spectre des complications vasculaires chez les personnes diabétiques/insulinorésistantes varie considérablement et peut mener à différents résultats.

### **1.5.3 Découplage de la réponse vasorelaxante**

#### **1.5.3.1 Diminution de synthèse de NO**

Comme nous venons de le souligner, la dysfonction endothéliale s'exprime par une perte de réactivité de l'endothélium à fournir les vasodilatateurs en quantité suffisante. Ceci mène à un déséquilibre qui entraîne un effet presseur accru provenant des vasoconstricteurs. Ce déséquilibre peut être encore plus grand si la quantité d'EDCF (endothelium-derived contracting factors) est augmentée dans ces mêmes conditions (DE VRIESE *et al.*, 2000). Le NO est probablement le vasodilatateur le plus puissant connu et de premier ordre (FLEMING et BUSSE, 1999). Les cellules endothéliales (entres autres) en produisent via l'activation de la monoxyde d'azote synthétase (NOS; MAYER et HEMMENS, 1997). La NOS génère le NO par la conversion de la L-arginine en L-citrulline par un mécanisme d'oxydation. Ce mécanisme enzymatique nécessite des co-facteurs qui permettent la libération de NO à partir de la L-arginine. L'oxygène, le calcium, la tétrahydrobioptérine (BH4) et le NADPH (Nicotinamine adénine dinucléotide phosphate) sont nécessaires pour l'activité de cette enzyme. Lorsque synthétisé, ce gaz diffuse de la cellule endothéliale vers les cellules

musculaires lisse, où se retrouve l'enzyme guanylate cyclase sous forme soluble. L'activation de cette enzyme par le NO mène à l'augmentation intracellulaire de GMPc (Guanosine monophosphate cyclique). Le GMPc est un second messenger important dans la relaxation des vaisseaux (IGNARRO et KADOWITZ, 1985). Son action majeure est attribuable à l'activation d'une protéine kinase dépendante du cGMP (protéine kinase G; PKG). L'activation des PKG semble réduire la concentration du calcium cytoplasmique qui est initialement responsable de la contraction (McDANIEL *et al.*, 1994).

La perte de production de NO est une conséquence d'une anomalie dans le fonctionnement de la monoxyde d'azote synthétase. Le problème peut se retrouver soit en amont de l'enzyme, c'est à dire dans la voie de signalisation activant la NOS, ou alors au niveau de l'enzyme même. On rapporte par exemple, que chez les modèles animaux de diabète/insulinorésistance, un supplément de L-arginine dans la diète améliore les fonctions endothéliales de ces animaux suggérant ainsi un déficit du substrat ou un mal fonctionnement de l'enzyme (PIEPER 1997; PIEPER 1998).

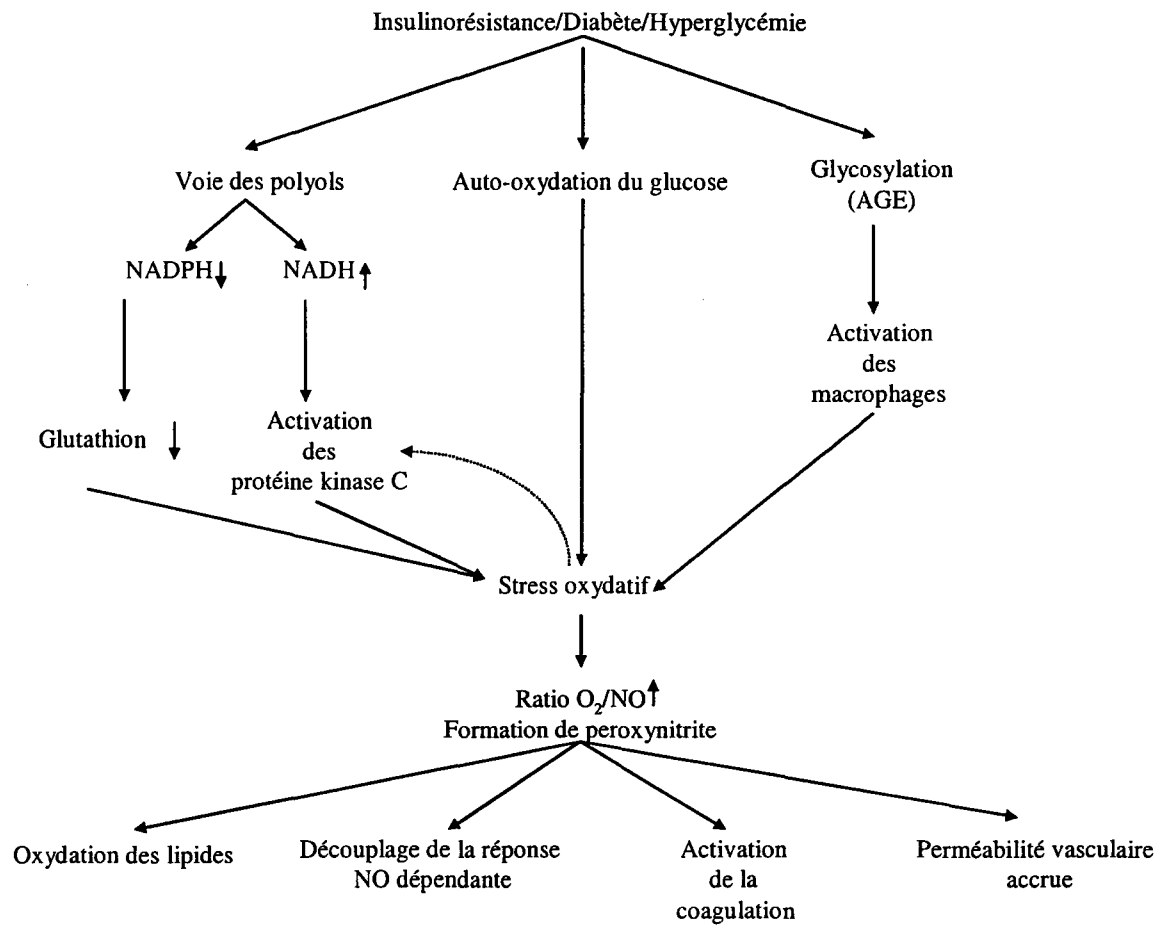
#### **1.5.3.2 Stress oxydatif, destruction du NO et voies métaboliques associées aux complications vasculaires**

Un élément important dans l'activité biologique du NO est sa biodisponibilité. Le NO est un gaz labile ayant une demi-vie très courte. Il réagit facilement avec des radicaux libres tels les superoxydes. Ce mécanisme (d'inactivation du NO) peut-être particulièrement important chez les patients diabétiques/insulinorésistants (HONING *et al.*, 1999; DE VRIESE *et al.*, 2000). Nous observons chez ces individus un métabolisme du glucose élevé ainsi que des radicaux oxygènes en grande concentration (stress oxydatif; GIUGLIANO *et al.*, 1996). Tous ces radicaux peuvent causer un dommage oxydatif important à différentes macromolécules (FIGURE 4). Le couplage du NO avec les superoxydes résulte en la formation de peroxynitrite (BECKMAN et KOPPENOL, 1996). Le peroxynitrite est un puissant oxydant pouvant réagir avec les composantes des membranes biologiques et mener à la peroxydation des lipides (LEEUWENBURGH *et al.*, 1997), à la nitration des acides aminés aromatiques tels la tyrosine (ISCHIROPOULOS *et al.*, 1992), endommager

directement l'ADN (SZABO *et al.*, 1996) et oxyder les antioxydants tels l'ascorbate et l'alpha-tocophérol (PRYOR et SQUADRITO, 1995).

Plusieurs voies biochimiques associées avec l'hyperglycémie telles l'auto-oxydation du glucose et l'activation de la voie des polyols augmentent la production de radicaux libres (FU *et al.*, 1994; DE VRIESE *et al.*, 2000). L'auto-oxydation du glucose mène à la formation non-enzymatique de produits avancés de la glycosylation (advanced glycosylation end-product; AGE) sur les groupements amino des protéines et des lipides. Il a été démontré que ces produits ont un effet sur la perméabilité vasculaire, augmentent le dépôt subintimal de protéines et de lipoprotéines et seraient potentiellement toxiques pour les cellules endothéliales, ils représentent donc d'importants facteurs athérogéniques (VLASSARA *et al.*, 1992; BUCALA *et al.*, 1993). On rapporte également que la prise des AGE par les macrophages infiltrés dans la région subendothéliale peut activer une réponse inflammatoire locale et contribuer davantage au stress oxydatif et augmenter les risques de formation de plaques d'athérome (RAJAGOPALAN *et al.*, 1996). De plus, l'interaction des AGEs avec leur récepteur cellulaire (RAGE) initie des mécanismes cellulaires pouvant augmenter le stress oxydatif (SCHMIDT *et al.*, 1999).

L'activation de la voie des polyols induit la production de diacylglycérol (DAG) par des intermédiaires glycolytiques (DERUBERTIS et CRAVEN, 1994). Le DAG peut ensuite activer les PKC et contribuer à la formation de radicaux oxygènes (KUNISAKI *et al.*, 1994). Les organismes vivants ont des mécanismes antioxydants pour pallier à la production de radicaux libres, mais il semble bien que les diabétiques possèdent une production réduite de l'antioxydant glutathion, les rendant ainsi plus fragiles au stress oxydatif (THORNALLEY *et al.*, 1996).



**FIGURE 4. Stress oxydatif relié aux complications de la résistance à l'insuline et du diabète.**

Adapté de Honing *et al.*, 1999.

### 1.5.4 Vasoconstricteurs

Nous venons de voir l'importance de la cellule endothéliale au niveau de la relaxation des vaisseaux et de l'implication de celle-ci dans les complications vasculaires liées à l'insulinorésistance. Dans cette section, nous allons décrire brièvement le fonctionnement de quelques systèmes d'importances impliqués dans la contraction des vaisseaux sanguins.

#### 1.5.4.1 Système adrénergique

Le système adrénergique fait partie du système nerveux sympathique, un régulateur important du système cardiovasculaire. En effet, le système sympathique agit entre autre sur le cœur ainsi que les vaisseaux périphériques. Les effets de ce système sont principalement effectués par la libération des catécholamines dont la norépinéphrine (noradrénaline) relâchée par les terminaisons nerveuses, et l'épinéphrine (adrénaline) relâchée par les glandes surrénales. L'action de ces médiateurs chimiques se fait via la liaison à des récepteurs couplés aux protéines G. Les adrénorécepteurs sont retrouvés pratiquement dans tous les tissus périphériques et sur plusieurs populations de neurones du système nerveux central et périphérique.

La pharmacologie du système adrénergique est connue depuis près de 50 ans. Un premier classement des récepteurs en deux types, soit  $\alpha$  et  $\beta$  basé sur leurs caractéristiques pharmacologiques (ordre puissance des agonistes) fut déterminé. Les informations obtenues grâce à la biologie moléculaire, combinées aux caractéristiques pharmacologiques, propose maintenant trois types majeurs de récepteurs soit :  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\beta$ . Chacun de ces types sont divisés en sous types ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ;  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  et  $\beta_4$ ; BYLUND *et al.*, 1994). Le dernier sous-type ici mentionné,  $\beta_4$ , est controversé puisque que ce dernier semble être une forme atypique du récepteur  $\beta_1$  avec différents états d'affinités face aux agonistes (LEWIS *et al.*, 2004).

### *Récepteur $\alpha$ -adrénergique*

Le type  $\alpha_1$  se retrouve généralement au niveau des organes effecteurs (e.g. muscle lisse vasculaire des artères) et est impliqué dans les fonctions excitatrices. Le type  $\alpha_2$  est quant à lui localisé au niveau pré et post-synaptique et régule la relâche des neurotransmetteurs (CIVANTOS CALZADA et ALEINXANDRE de ARTIÑANO, 2001). Les deux types de récepteurs sont reconnus pour avoir une importance sur le tonus vasculaire. Les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques sont couplés au protéine G de type  $G_p/G_q$  et active la phospholipase C et mène à la production de seconds messagers, tels l'inositol 1,4,5-triphosphate ( $IP_3$ ) et le DAG. L' $IP_3$  active la relâche du calcium dans le cytosol. Ce mécanisme, lorsque initié dans le tissu vasculaire mène à la contraction des vaisseaux (ABOUD *et al.*, 1993). Les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques sont également localisés au niveau du cœur et augmentent la force de contraction de cet organe (inotrope positif).

Les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques sont principalement couplés au protéine G de type  $G_i/G_o$  et ont un effet inhibiteur sur l'adénylate cyclase. L'activation de ces récepteurs mène donc à la diminution de l'AMPc intracellulaire. Au niveau cardiovasculaire, les agonistes  $\alpha_2$ -adrénergiques cause une hypotension et de la bradycardie.

### *Récepteur $\beta$ -adrénergique*

Les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques sont largement distribués au niveau du système nerveux central et périphérique. Leurs fonctions biologiques sont multiples et agissent sur plusieurs systèmes. Au niveau du système cardiovasculaire, ils peuvent stimuler le rythme cardiaque ainsi que la force de contraction du cœur ( $\beta_1$ ) ou relaxer le muscle lisse (vasculaire et non vasculaire;  $\beta_2$ ). Ce type de récepteur est également impliqué dans des fonctions endocrines telles la sécrétion d'insuline et de glucagon par le pancréas ou la sécrétion de rénine par l'appareil juxtaglomérulaire. Les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques régissent également des



fonctions physiologiques comme la stimulation de la glycogénolyse au niveau du foie et du muscle squelettique et la stimulation de la lipolyse chez les adipocytes.

Les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ) sont reconnus pour leurs effets positifs sur l'adénylate cyclase. Ces récepteurs sont couplés aux protéines G de type  $G_s$  et stimulent la production d'AMPc. Les récepteurs  $\beta_2$  et  $\beta_3$  sont également reconnus pour inhiber la production d'AMPc (BYLUND *et al.*, 1994). Au niveau du système vasculaire, le récepteur  $\beta_2$  est un agent relaxant et est reconnu pour réguler le flot sanguin des coronaires et des artères de résistance du muscle strié (BARON *et al.*, 1972).

#### 1.5.4.2 Système endothélinergique

Un des plus puissants vasoconstricteurs connu est un EDCF ou endothéline (ET). ET est un peptide de 21 acides aminés qui fût isolé à partir du surnageant de culture de cellules endothéliales d'aorte thoracique porcine (YANAGISAWA *et al.*, 1988). Chez l'humain, on retrouve trois gènes distincts de l'ET, qui codent pour trois isoformes : ET-1, ET-2 et ET-3 (INOUE *et al.*, 1989). Ces différentes isoformes proviennent de la maturation de précurseurs. Par exemple, la prépro ET-1 (212 acides aminés) est clivée par des endopeptidases de type furine (furine et PC7) de la voie de sécrétion constitutive (LAPORTE *et al.*, 1993; BLAIS *et al.*, 2002). Par la suite, des carboxypeptidases enlèvent séquentiellement les deux derniers acides aminés en C-terminal de ce peptide afin de générer la big ET-1 (38 a.a.). Finalement, l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) clive spécifiquement la big ET-1 afin de libérer l'ET-1 (21 a.a.) active, ainsi qu'un fragment C-terminal (YANAGISAWA *et al.*, 1988) qui ne possède aucune propriété vasoactive (D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 1991). Ce processus de maturation est similaire pour les autres isoformes d'endothéline (ET-2, ET-3).

Le système endothélinergique est constitué de deux récepteurs couplés aux protéines G, soit les récepteurs  $ET_A$  et  $ET_B$ . L'ordre d'affinité des diverses endothélines pour le récepteur  $ET_A$  est  $ET-1 \geq ET-2 > ET-3$  (ET-1 a une affinité 100 fois plus grande que ET-3) (LIN *et al.*,

1991). Le récepteur ET<sub>B</sub> a une affinité équipotente pour les trois isoformes de l'ET : ET-1 = ET-2 = ET-3 (SAKAMOTO *et al.*). Au niveau des vaisseaux sanguins, les récepteurs ET<sub>A</sub> sont principalement situés sur les cellules musculaires lisses et provoquent, lorsqu'ils sont activés, une contraction via l'augmentation cytoplasmique du niveau calcique (GOTO *et al.*, 1989; IWAMURO *et al.*, 1999). Le récepteur ET<sub>B</sub> pour sa part est localisé plus particulièrement à la surface des cellules endothéliales et provoque la libération de facteurs relaxants tels la PGI<sub>2</sub> et le NO (HYSLOP et DE NUCCI, 1992). Des études *in vitro* sur diverses veines et artères de plusieurs espèces animales, démontrent cependant l'implication du récepteur ET<sub>B</sub> dans la vasoconstriction (NISHIYAMA *et al.*, 1995; SUDJARWO *et al.*, 1993). Par ailleurs, une étude a révélé la présence de deux types de récepteur ET<sub>B</sub> (veine saphène latérale de lapin). Ainsi, les récepteurs ET<sub>B</sub> des cellules endothéliales (ET<sub>B1</sub>) activeraient la libération de facteurs relaxants, alors que les récepteurs ET<sub>B</sub> du muscle lisse (ET<sub>B2</sub>) provoqueraient la contraction via l'augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire (DOUGLAS *et al.*, 1995).

#### 1.5.4.3 Le système rénine-angiotensine

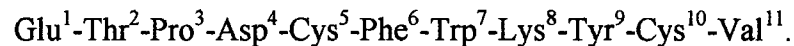
La rénine est une aspartyl protéase sécrétée par les cellules juxtaglomérulaires du rein (HOBART *et al.*, 1984). Elle possède comme substrat l'angiotensinogène, qui, sous l'action hydrolytique de la rénine libère le décapeptide angiotensine I (Ang I). L'Ang I est à son tour clivé en angiotensine II (Ang II) par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). L'Ang II est un octapeptide (Asp<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>) reconnu pour avoir plusieurs effets biologiques : 1) la vasoconstriction, 2) la propriété d'activer la migration, la prolifération ainsi que l'hypertrophie du muscle lisse vasculaire, 3) l'augmentation de la formation de la matrice extracellulaire, 4) l'augmentation de la relâche d'aldostérone par les surrénales, 5) l'activation de la relâche de corticotropine et de vasopressine et 6) l'activation de la glycogénolyse au niveau du foie (FERRARIO, 1990). L'effet majeur de l'action du système rénine-angiotensine se manifeste généralement par un effet presseur direct ou indirect de l'Ang II. Bien que l'Ang I possède la séquence peptidique nécessaire à l'activité biologique, on ne lui reconnaît pas d'activité biologique majeure. L'Ang II peut être

convertie en un fragment plus petit par l'aminopeptidase A donnant l'Ang III (Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe). Elle peut également être convertie en Ang IV (Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) sous l'action de l'aminopeptidase B ou de l'aminopeptidase M. Il a été aussi démontré que l'Ang II, sous l'action de la carboxypeptidase P, et que l'Ang I, sous l'action d'endopeptidases mène à la formation de l'Ang(1-7). Les produits de dégradation de l'Ang II que nous venons de décrire possèdent également des effets biologiques spécifiques (WRIGHT et HARDING, 1997; KUCHARWICZ *et al.*, 2002). L'Ang II utilise deux récepteurs couplés à des protéines G pour ses actions biologiques, soient les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>. Il semblerait que les effets physiologiques principales de l'octapeptide soient attribuables à l'activation du récepteur AT<sub>1</sub>. L'activation de ce dernier a pour effet d'activer la phospholipase C (PLC) (LASSÈGUE *et al.*, 1993) et induire une augmentation d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) ainsi que la formation de diacylglycérol (DAG; USHIO-FUKAI *et al.*, 1998). L'IP3 active alors la libération de calcium à partir des réservoirs intracellulaires (BERRIDGE et IRVINE, 1989). L'élévation du calcium cytosolique active à son tour la calmoduline qui permet l'activation des kinases calmoduline-dépendantes pour propager le signal (KLEE, 1988). Un tel mécanisme explique l'effet vasoconstricteur de l'Ang II. Le DAG active plusieurs isoformes de PKC reconnu pour activer la voie des MAP kinases (MOLLOY *et al.*, 1993). Toujours via AT<sub>1</sub>, on reconnaît que l'Ang II peut activer d'autres voies de signalisation impliquant notamment JAK2 (Janus Kinase 2), TYK2 (Tyrosine Kinase 2) et PYK2 (Proline rich Tyrosine Kinase 2, GRIENDLING *et al.*, 1997) mais aussi FAK (Focal Adhesion Kinase) et JAK/STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) reconnues pour leurs rôles dans l'inflammation (TOUYZ et BERRY, 2002).

#### 1.5.4.4 L'urotensine II

L'urotensine-II (U-II) fut originalement identifiée chez les poissons téléostéens. Ce peptide possède plusieurs actions biologiques variées. Il influence entre autre le système nerveux central (locomotion), les systèmes endocriniens (sécrétion de prolactine et d'insuline), les voies aériennes (bronchoconstriction) ainsi que le système cardiovasculaire. Les études *in vitro* démontrent que l'U-II est un puissant vasoconstricteur comparable à l'ET-1. *In vivo*

cependant, il est possible d'observer un effet vasorelaxant chez le rat (MAGUIRE et DAVENPORT, 2002). La structure de l'U-II est hautement conservée à travers les espèces et ce même chez les vertébrés et les invertébrés. Le peptide humain fut cloné récemment (COULOUARN *et al.*, 1998) et la structure primaire se lit comme suit :



La partie cyclique du peptide comprise entre les deux cystéines (Cys<sup>5</sup>-Cys<sup>10</sup>) est la région conservée dans toutes les espèces et semble être nécessaire pour l'activité biologique (MAGUIRE et DAVENPORT, 2002). La désorphanisation du récepteur GPR14, un récepteur couplé aux protéines G, a permis de mettre à jour le mécanisme responsable de l'effet de l'U-II (AMES *et al.*, 1999). L'undécapeptide agit comme un puissant vasoconstricteur (MAGUIRE et DAVENPORT, 2002) et est particulièrement actif sur certaines préparations artérielles de lapin et de rat (CAMARDA *et al.*, 2002). Chez ces espèces, il semble toutefois que la réponse à ce peptide ne soit pas uniforme. En effet, l'aorte de rat répond à l'U-II mais certains lits vasculaires tels le poumon et le lit mésentérique demeurent insensibles à ce peptide (GENDRON, *et al.*, 2001). Chez le primate par contre, l'U-II démontre une réactivité artérielle plus large et uniforme (AMES *et al.*, 1999;). On rapporte également que le récepteur GPR14/UT est largement distribué dans le système cardiovasculaire de l'homme (CAMARDA *et al.*, 2002; KATUGAMPOLA *et al.*, 2002). L'observation récente de changements au niveau des taux circulants d'U-II et d'expression du récepteur GPR14 (UT) dans l'insuffisance cardiaque suggère un rôle possible de ce peptide dans les complications cardiovasculaires (DOUGLAS *et al.*, 2002; RICHARDS *et al.*, 2002).

Nous venons de décrire l'implication de l'endothélium dans le système vasculaire ainsi que différents systèmes impliqués dans la régulation du tonus vasculaire. Dans les prochaines sections, nous allons présenter quelques modèles animaux utilisés pour étudier la résistance à l'insuline.

## **1.6 Modèles animaux pour l'étude de la résistance à l'insuline et du diabète**

Plusieurs modèles animaux ont été étudiés pour élucider les complications cardiovasculaires associées avec le diabète et la résistance à l'insuline. Nous allons décrire ici quelques modèles de rat couramment utilisés en recherche pour le diabète de type 1 et de type 2.

### **1.6.1 Le rat traité à la streptozotocine**

Sans aucun doute, le modèle le plus utilisé pour l'étude des complications reliées au diabète type 1 est le rat traité à la streptozotocine (STZ). La STZ est une toxine produite par le *Streptomyces achromogene*. Cette toxine possède des activités antibiotiques et antinéoplasiques capables d'induire un diabète via une toxicité directe sur les cellules  $\beta$  du pancréas (BOLZAN et BIANCHI, 2002). Ce modèle est caractérisé par une hypoinsulinémie et une hyperglycémie sévères, le tout associé avec des complications vasculaires (FUKAO *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 1998; SHARMA *et al.*, 1999). Même si le traitement avec cette toxine mène à une cachexie importante, la communauté scientifique accepte bien ce modèle et son utilisation a permis de faire avancer considérablement les connaissances sur les complications associées au diabète type 1.

### **1.6.2 Le rat Zucker et le rat corpulent de type JCR:LA**

Pour l'étude de la résistance à l'insuline (type 2), nous retrouvons entre autre le rat Zucker et le rat corpulent de type JCR:LA-cp. Ces deux modèles animaux ont la particularité d'avoir un défaut génétique au niveau du système de la leptine. Le rat obèse Zucker fut décrit pour la première fois en 1961 par Theodore et Lois Zucker alors que le caractère obèse apparut spontanément à la treizième génération d'une colonie étudiée à Stow au Massachusetts. Ce rat est porteur de la mutation *fa/fa*, codant pour une forme mutante du récepteur à la leptine (ObR; BRINDLEY et RUSSELL, 2002). Ceci lui attribue un comportement hyperphagique qui mène à l'obésité dès l'âge de quatre semaines. Le rat Zucker est résistant à l'insuline, hyperinsulinémique, hyperlipidémique et intolérant au glucose sans toutefois devenir

diabétique. On rapporte également des complications cardiovasculaires chez ce rat (TOBLLI *et al.*, 2003) quoique celles-ci ne soient pas reconnues comme étant sévères (PIEPER 1998; RUSSELL, 2001). Dans une colonie de rats à l'Université de l'Indiana, on remarqua que certains Zucker développaient le diabète (CLARK *et al.*, 1981). Une variante du rat Zucker fut alors développée par une technique sélective d'élevage basée sur le trait diabétique donnant le Zucker diabetic fatty (ZDF) rat. Le rat ZDF, lorsque nourri avec une diète riche en lipides développe une résistance à l'insuline progressant en diabète de type 2 (FINEGOOD *et al.*, 2002). On observe de plus chez ces animaux une hypercholestérolémie. Le rat ZDF représente donc davantage un modèle animal de progression vers le diabète associé avec une obésité alors que le Zucker est un modèle de rat obèse résistant à l'insuline.

Le rat corpulent de type JCR:LA-*cp* découle d'une souche congénique Lister-Albany/NIH-*cp* (LA/N) porteuse de la mutation corpulente (*cp*) survenue dans l'élevage de SHR de Koletsky (SHAFRIR, 1992). Une variante de cette souche fut développée par James C. Russell de l'Université de l'Alberta. Les rats homozygotes de cette souche porteuse du gène autosomal récessif *cp/cp*, sont obèses et deviennent rapidement résistants à l'insuline et hypertriglycéridémiques (DOLPHIN *et al.*, 1987; RUSSELL *et al.*, 1989). Tout comme les rats Zucker, leur gène *ob*, codant pour la leptine, est normal et est identique à ce que l'on peut retrouver chez les Sprague-Dawley (VYDELINGUM *et al.*, 1995). La mutation *cp* mène par contre à l'apparition d'un codon stop dans le domaine extracellulaire du gène ObR menant ainsi à une absence complète du récepteur à la surface membranaire (WU-PENG *et al.*, 1997). Les rats JCR:LA-*cp* développent une vasculopathie, des lésions athérosclérotiques dans les artères d'importances et de l'ischémie myocardiale donnant lieu à des infarctus du myocarde (RUSSELL, 2001). Ce modèle représente donc très bien les complications cardiovasculaires associé avec la résistance à l'insuline et l'obésité et trouve des similarités avec ce qui est observé chez l'humain.

### 1.6.3 Le rat de sable (*Psammomys obesus*)

Outre les modèles animaux où il existe des défauts génétiques, il est possible d'induire la résistance à l'insuline chez certaines espèces grâce à un changement de leurs habitudes

alimentaires. Un modèle intéressant pour l'étude de la résistance à l'insuline est le rat de sable ou *Psammomys obesus*. L'habitat naturel de ce rat se résume à des régions désertiques où il subsiste avec une diète composée d'arbustes et de plantes et où il demeure mince et normoglycémique (SHAFRIR et GUTMAN, 1993). Cependant, lorsque maintenu dans des conditions d'animalerie sous une diète de rongeurs standard, il développe plusieurs anomalies métaboliques (BARNETT *et al.*, 1994). À l'âge de 16 semaines, le tiers des animaux sont tolérants au glucose, un tiers sont hyperinsulinémiques et normoglycémiques et un tiers sont obèses diabétiques et dyslipidémiques (BARNETT *et al.*, 1994; WALDER *et al.*, 2002). Cette réponse hétérogène indique que *Psammomys obesus* représente un modèle animal polygénique de diabète. De plus, la fraction d'animaux ayant les traits pathologiques démontre quatre éléments importants en relation avec le syndrome métabolique : l'obésité, la résistance à l'insuline, le diabète type 2 et de la dyslipidémie (WALDER *et al.*, 2002). On n'a pas encore rapporté de défauts génétiques chez ce rat. Ce modèle animal permet l'étude des changements métaboliques associés avec les habitudes de vie.

#### **1.6.4 Le rat nourri au fructose**

Il existe également des modèles animaux générés par des diètes alimentaires spécifiques. Des diètes riches en sucrose ou fructose par exemple furent utilisées pour étudier le métabolisme du glucose et la résistance à l'insuline. Le sucrose est un disaccharide composé d'une unité de glucose et d'une unité de fructose. On rapporte que le fructose serait le principal médiateur dans le développement de la résistance à l'insuline (THRESHER *et al.*, 2000). Il a été démontré chez le rat qu'une diète riche en hydrate de carbone menait à une diminution de la sensibilité à l'insuline soit avec le fructose (SLEDER *et al.*, 1980; TOBEY *et al.*, 1982), soit avec le sucrose (GUTMAN *et al.*, 1987; SANTURÉ *et al.*, 2002). De plus, une diète riche en hydrates de carbone est associée avec une hyperinsulinémie compensatoire (HWANG *et al.*, 1987) et une l'hypertension (HWANG *et al.*, 1987; REAVEN et HO, 1991) alors que d'autres études ne rapportent pas d'élévation de la pression artérielle (BRAND *et al.*, 1994; SANTURÉ *et al.*, 2002).

Puisque nous nous intéressons aux complications associées à la résistance à l'insuline, nous avons choisi d'utiliser le modèle de rat nourri au fructose. Ce modèle fut popularisé par le groupe de Gerald M. Reaven à l'Université de Stanford au début des années 80. Ce modèle animal est caractérisé par une intolérance au glucose, une résistance périphérique à l'insuline, une hyperinsulinémie, une dyslipidémie ainsi qu'une l'hypertension artérielle et ce, en absence d'obésité (SLEDER *et al.*, 1980; TOBEY *et al.*, 1982; ZAVARONI *et al.*, 1982; HWANG *et al.*, 1987). Ce modèle est donc approprié pour étudier les changements éventuels de la réactivité vasculaire en relation avec la résistance à l'insuline.

### **1.7 Causes de l'insulinorésistance chez le rat nourri au fructose**

Les raisons du développement des anomalies métaboliques chez le rat nourri au fructose restent encore mal comprises. Nous ne connaissons pas plus les bases moléculaires exactes pour expliquer le rôle du fructose dans le développement de l'insulinorésistance. Il semble néanmoins que la diète au fructose affecte l'activité de plusieurs enzymes et agit sur le métabolisme des glucides au niveau hépatique menant ainsi à une l'insulinorésistance au niveau du foie (BLAKELY *et al.*, 1981; TOBEY *et al.*, 1982).

De récentes études démontrent l'implication du TNF $\alpha$  dans la pathogenèse de la résistance à l'insuline chez le rat nourri au fructose. En effet, il semble qu'au niveau du muscle squelettique, cette cytokine soit importante dans la genèse de la résistance à l'insuline (TOGASHI *et al.*, 2000; TOGASHI *et al.*, 2002). Avant la publication de ces études, l'implication du TNF $\alpha$  dans l'insulinorésistance était surtout associée avec l'obésité (KAHN, 1997; PERALDI et SPIEGELMAN, 1998). De plus, on observe que la diète au fructose affecte la signalisation de l'insuline de façon sélective. On rapporte, en outre chez le rat nourri au fructose, que la voie de signalisation de la PI3-kinase serait sélectivement touchée alors que d'autres voies de signalisation, comme celle de MAPK, resteraient pleinement fonctionnelles (BEZERRA *et al.*, 2000; HYAKUKOKU *et al.*, 2003). Cette dernière voie de signalisation est reconnue comme la voie mitogénique de l'insuline et pourrait expliquer partiellement l'augmentation des complications vasculaires reliées à l'insulinorésistance. Il



est intéressant de soulignée que la voie de signalisation de la PI3-kinase est également sélectivement altérée chez le rat Zucker, un autre modèle animal de résistance à l'insuline (JIANG *et al.*, 1999).

## **1.8 Complications vasculaires retrouvées chez le rat nourri au fructose**

### **1.8.1 Perméabilité vasculaire**

Notre groupe a jusqu'à maintenant davantage exploré les anomalies du système vasculaire en étudiant la perméabilité vasculaire chez le rat nourri au fructose. En effet, ce modèle a permis de mettre en évidence une réduction de la perméabilité capillaire qui semble être plus sévère dans le muscle squelettique (CHAKIR *et al.*, 1998). Ceci peut refléter une dysfonction endothéliale spécifique à ce tissu et théoriquement expliquer l'incapacité de l'insuline à se rendre à son lieu d'action. Il est difficile de faire une relation avec les études de Togashi et collaborateurs (TOGASHI *et al.*, 2000; TOGASHI *et al.*, 2002) et celle de notre groupe, mais il semble bien que le muscle squelettique soit un tissu affecté par la résistance à l'insuline.

### **1.8.2 Dysfonction endothéliale**

Les anomalies observées dans le tissu vasculaire chez le rat nourri au fructose sont nombreuses. Comme mentionné plus haut, la cellule endothéliale est une cible d'altérations multiples. Une diminution dans les taux de production des différents vasorelaxants produits par l'endothélium tels l'EDHF (KATAKAM *et al.*, 1999) et le NO (VERMA *et al.*, 1996; SHINOZAKI *et al.*, 1999; TAKAGAWA *et al.*, 2001) constitue une des manifestations accompagnant la dysfonction endothéliale dans ce modèle animal. La présence de taux élevés en radicaux libres dans la circulation de ces animaux (KASHIWAGI *et al.*, 1999) ainsi que la diminution d'expression de la monoxyde d'azote synthétase endothéliale (eNOS; SHINOZAKI *et al.*, 1999; MIATELLO *et al.*, 2001) serait en cause pour expliquer la diminution de NO relâché.

### 1.8.3 Hypertension

L'hypertension est une anomalie importante souvent associée avec la résistance à l'insuline. Différentes possibilités ont été explorées afin de déterminer les causes de l'hypertension chez le rat nourri au fructose. Il semble que nous devons exclure la rétention sodique par le rein pour expliquer la hausse de tension chez ce modèle et que l'augmentation en volume des fluides ne serait pas plus impliquée (IYER et KATOVICH, 1996). La diète au fructose semble tout de même avoir un effet sur le rein car une hyperfiltration et une hyperplasie mésangiale ont été notées dans les reins des animaux nourris au fructose (MANITUS *et al.*, 1995).

D'autres équipes de chercheurs ont étudié les changements au niveau de différents tissus. Ils rapportent que les taux de calcium cytosolique sont plus élevés chez ces animaux en partie à cause du niveau tissulaire élevé d'aldéhydes conjugués (VASDEV *et al.*, 1998). La diète au fructose est également reconnue pour apporter des changements au niveau de la glycosylation tissulaire (LEVI et WERMAN, 1998). Les effets les plus dommageables des produits avancés de la glycosylation (AGE) sont leur action sur la demi-vie du NO (BROWNLEE, 1991). Ces produits diminuent donc la quantité de NO circulant tout en augmentant la susceptibilité des LDL à l'oxydation par les radicaux libres (BUCALA *et al.*, 1991). Ceci peut avoir un effet direct sur la réactivité vasculaire et être associé à l'hypertension.

Une autre cause potentielle d'hypertension chez le rat nourri au fructose serait une augmentation de l'expression d'endotheline-1 (ET-1), un puissant vasoconstricteur (LEE *et al.*, 2001). De plus, des variations dans la densité des récepteurs ET<sub>A</sub>, au niveau de l'aorte thoracique (JUAN *et al.*, 1998), seraient aussi associées à un l'effet presseur vasculaire. Le muscle lisse vasculaire lui-même serait touché par les modifications métaboliques apportées par la diète au fructose. La prolifération de ces cellules serait plus grande chez le rat nourri au fructose (MIATELLO *et al.*, 2001).

Les récepteurs AT<sub>1</sub> semblent également être modifiés. On rapporte une augmentation de la densité réceptorielle au niveau du ventricule gauche (IYER *et al.*, 1994) et au niveau des

adipocytes (GIACCHETTI *et al.*, 2000). Des taux circulants élevés en angiotensine II ainsi qu'en d'endothéline-1 ont aussi été rapportés dans les études de Iyer et Juan (IYER *et al.*, 1994; JUAN *et al.*, 1998). Il semble donc y avoir une pléiade d'événements pouvant mener à l'hypertension dans ce modèle animal. Il faudra cependant élaborer davantage sur la relation entre ces différents mécanismes pour comprendre et intégrer ces éléments dans la pathologie de la résistance à l'insuline.

#### **1.8.4 Implication du système rénine-angiotensine**

Le système rénine-angiotensine semble avoir une importance dans les complications vasculaires chez le rat nourri au fructose. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ainsi que les antagonistes du récepteur AT<sub>1</sub> ont des effets bénéfiques sur la sensibilité à l'insuline qui se manifeste par une diminution de pression artérielle et une stabilisation de l'insulinémie, de la triglycéridémie et de la glycémie (ERLICH et ROSENTHAL, 1995; IIMURA *et al.*, 1995; ROSENTHAL *et al.*, 1995; CHEN *et al.*, 1996; MIATELLO *et al.*, 1998; URA *et al.*, 1999; HIGASHIURA *et al.*, 2000; MIATELLO *et al.*, 2002). Ceci n'a pas été nécessairement démontré avec d'autres anti-hypertensifs (KAMIDE *et al.*, 2002). De plus, l'utilisation d'antisenses dirigés contre le récepteur AT<sub>1</sub> mène à l'amélioration de différents paramètres physiologiques chez le rat nourri au fructose (KATOVICH *et al.*, 2001). L'effet protecteur des inhibiteurs de l'ECA est bien sûr attribuable à la diminution de conversion de l'Ang I en l'Ang II, diminuant ainsi les multiples effets que ce peptide pourrait avoir sur la pression artérielle. Par exemple, l'effet bénéfique de l'énalapril semble impliquer la relâche de NO et suggère l'implication de mécanismes biologiques complémentaires (ERLICH et ROSENTHAL, 1996). Les inhibiteurs de l'ECA ont aussi un effet sur la quantité des kinines circulantes. Ces autacoïdes sont également des substrats de l'ECA et l'inhibition de cette enzyme pourrait accroître les taux de bradykinine (BK) circulante et contribuer à l'effet bénéfique des inhibiteurs de l'ECA. On rapporte notamment de tels effets chez les rats SHR (TOMIYAMA *et al.*, 1994). Il semble également possible que la BK initie des mécanismes pouvant aider à rétablir les fonctions métaboliques chez le rat nourri au fructose (ERLICH et ROSENTHAL, 1998). La participation du NO

dans l'amélioration des paramètres physiologiques ne fait toutefois pas l'unanimité (ERLICH *et al.*, 2001). D'autres études n'ont pas démontré d'effets significatifs des kinines avec un traitement à l'alacépril (CHEN *et al.*, 1996). L'utilisation de modèles animaux, de conditions expérimentales ainsi que d'agents pharmacologiques différents rendent l'interprétation des résultats très difficile. Des études plus standardisées devront être menées afin de mieux élucider le mécanisme derrière l'effet bénéfique des inhibiteurs de l'ECA chez le rat insulino-résistant/hypertendu.

Il est intéressant de mentionner que l'effet bénéfique de l'inhibition du système rénine-angiotensine (RAS) a également été observé chez l'homme (CHEETAM *et al.*, 2000). Les agents sensibilisateurs à l'insuline, dont la metformine et les thiazolidinediones, sont également efficaces à rétablir les paramètres physiologiques chez l'homme et les modèles animaux de résistance à l'insuline tel le rat nourri au fructose (VERMA *et al.*, 1994; YAGI *et al.*, 1995; FAURE *et al.*, 1999; BARNETT, 2002). Ces similarités confirment que l'utilisation de ce modèle animal est pertinente pour étudier la dysfonction vasculaire caractéristique de l'insulino-résistance.

La réactivité vasculaire, associée avec la résistance à l'insuline, se résume donc à une dysfonction endothéliale et une hyperréactivité du muscle vasculaire lisse à certains agents vasoconstricteurs. L'intégrité du muscle lisse n'a cependant jamais été étudiée de façon exhaustive. Les études ayant rapporté une dysfonction endothéliale, comme celle de Shinozaki et collaborateurs (SHINOZAKI *et al.*, 1999), assument que le muscle lisse fonctionne normalement car la réactivité à des donneurs de NO (e. g. nitroprussiate de sodium) reste inchangée entre les animaux contrôles et les animaux résistants à l'insuline. Ceci démontre simplement que l'axe NO-GMPc du muscle lisse vasculaire est intact dans ce modèle animal. Qu'en est-il des autres voies de signalisation impliquées dans la relaxation du muscle lisse vasculaire (e. g. adénylate cyclase-AMPc-canaux potassiques)? Nous devons également pousser plus loin l'étude des différents systèmes pour vérifier leur fonctionnement lorsque associé avec ce désordre métabolique.

Contrairement aux autres modèles animaux décrits plus haut, la résistance à l'insuline chez le rat nourri au fructose n'est pas associée à l'obésité ou à un diabète franc. Ceci permet l'étude des complications vasculaires dans un contexte physiopathologique où l'hyperglycémie ambiante ne contribue pas de façon significative aux anomalies vasculaires.

## **1.9 Hypothèse générale et objectifs spécifiques**

L'hypothèse de notre travail est que, outre la dysfonction endothéliale, la résistance à l'insuline peut toucher directement le muscle vasculaire lisse. Le projet veut mieux explorer l'intégrité du muscle lisse vasculaire dans un modèle de résistance à l'insuline, le rat nourri au fructose. Pour ce faire, nous utiliserons l'aorte thoracique et les carotides communes, deux artères de conductance. L'utilisation de la carotide de rat dans cette étude nous permettra d'obtenir des résultats originaux, puisque cette préparation vasculaire semble avoir été négligée dans ce genre d'expérimentation.

### **1.9.1 Objectifs spécifiques**

Étudier la relaxation endothélium dépendante à l'ACh pour estimer la fonction endothéliale dans l'aorte thoracique et les carotides communes de rat. La comparaison sera faite entre le groupe contrôle et le groupe nourri au fructose. Nous allons vérifier si la relâche de différents vasorelaxants (NO, EDHF) par la cellule endothéliale est touchée dans le contexte physiopathologique de la résistance à l'insuline.

Sans vouloir négliger la dysfonction endothéliale, nous nous concentrerons sur la réactivité du muscle vasculaire lisse. En utilisant les deux mêmes préparations (aorte et carotide), nous voulons évaluer la sensibilité du muscle lisse vasculaire face à différents agonistes ayant une action directe sur ce type cellulaire. Pour ce faire, nous utiliserons des vasorelaxants ainsi que des vasoconstricteurs sur l'aorte et la carotide dépourvues de leur endothélium. De cette façon, nous évitons l'interférence de l'endothélium comme source d'antagonistes physiologiques. Nous allons comparer la réponse du muscle lisse vasculaire des animaux nourris au fructose à celle des animaux contrôles. De plus, nous analyserons les voies de

signalisation impliquées dans la relaxation du muscle lisse vasculaire (AMPc/GMPc-dépendante) pour mettre en évidence les différences possiblement observables chez l'animal insulino-résistant.

Cette étude se veut donc une étude pharmacologique de la réactivité vasculaire de l'aorte thoracique et des carotides communes, en utilisant le rat nourri au fructose comme modèle animal. L'utilisation d'agonistes peptidiques et non-peptidiques permettra de couvrir différents systèmes et d'étudier les effets de l'insulino-résistance sur ces derniers.

## **Matériels et Méthodes**

### **2.1 Modèle animal : le rat nourri au fructose**

Des rats mâles Sprague-Dawley (Charles River; St-Constant, Québec) âgés de 10-12 semaines sont nourris avec une nourriture enrichie en fructose (60% fructose, 5% gras, 18% protéines; Teklad Labs, Madison, WI) pendant quatre semaines. Parallèlement, des rats de même âge sont nourris avec une diète normale et serviront de groupe contrôle. Les animaux sont dans un environnement contrôlé avec un cycle lumière/obscurité de 12 heures. La diète au fructose débute toujours une semaine après l'arrivée des animaux leur laissant ainsi une période d'adaptation à leur nouvel environnement. À la fin de cette période d'adaptation, les rats sont assignés aléatoirement soit au groupe contrôle ou au groupe fructose. Le poids des animaux est pris dès le début de l'expérience et est ensuite suivi de façon hebdomadaire jusqu'à la fin de l'expérience.

### **2.2 Détermination des paramètres physiologiques des animaux**

#### **2.2.1 Pression artérielle**

La pression artérielle des rats est déterminée de façon indirecte à l'aide d'un sphygmomanomètre (IITC Model 31) placé sur la queue. Cet appareil nous permet d'évaluer la pression systolique et diastolique des rats utilisés pour l'étude. Ceux-ci seront préalablement placés dans une chambre à 29°C pour une période de 30 minutes. Ceci permet de calmer les animaux et de maintenir le système vasculaire dans un état relativement stable pour faciliter la prise des données. Nous tentons également d'avoir une atmosphère détendue dans la pièce tout le long de la procédure. La pression artérielle est déterminée pour les deux groupes d'animaux (contrôle et fructose) dès le premier jour de la diète au fructose (temps zéro) et reprise une seconde fois lors de la première semaine du début du traitement. Elle est

ensuite prise de façon hebdomadaire jusqu'à la quatrième semaine. Puisque l'on observe des variations entre les différentes prises de données, les pressions sont enregistrées jusqu'à ce que trois valeurs consécutives soient uniformes.

### **2.2.2 Prélèvement du sang**

Lors du sacrifice de l'animal, le sang de ce dernier est récupéré par ponction intracardiaque à l'aide d'une seringue de 10 mL (Becton Dickinson; aiguille 18 G 1 1/2). Le sang prélevé est ensuite versé dans des tubes de plastiques et centrifugés (14000g) pendant 3-5 minutes. Le sérum est ensuite congelé à  $-80^{\circ}\text{C}$  et sera utilisé ultérieurement pour l'évaluation des paramètres sanguins.

### **2.2.3 Évaluation de la glycémie**

La détermination du glucose plasmatique est obtenue grâce à la méthode de la glucose oxydase (ThermoDMA, TX, USA). Dans cette méthode, le glucose sérique est transformé en gluconolactate et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier oxyde le 4-aminoantipyrine et le *p*-hydroxybenzoate en présence d'une peroxydase et forme un chromogène rouge qui est directement proportionnel à la concentration de glucose contenu dans le sérum. Les duplicata sont lus à l'aide d'un spectrophotomètre (510 nm).

### **2.2.4 Évaluation de l'insulinémie**

La quantification de l'insuline dans le sang est faite à l'aide d'un essai radio-immunologique utilisant un anticorps dirigé spécifiquement contre l'insuline de rat (Rat insulin RIA kit, Linco, MO, USA). Dans des tubes de borosilicate, 50  $\mu\text{L}$  d'échantillon (sérum) ou de standard (Courbe standard 0.1-10 ng/mL) sont ajoutés à 50  $\mu\text{L}$  de tampon d'essai en duplicata. Cent  $\mu\text{L}$  de tampon d'essai sont ajoutés aux tubes désignés pour évaluer la liaison non spécifique. Cinquante  $\mu\text{L}$  d'insuline- $\text{I}^{125}$  sont ensuite ajoutés à tous les tubes alors que 50  $\mu\text{L}$  d'anticorps anti-insuline sont ajoutés à tous les tubes à l'exception des tubes qui serviront à déterminer la radioactivité totale et la liaison non spécifique. Le tout est vortexé



et incubé pendant 18-24 heures à 4°C. Lorsque l'incubation est terminée, 500 µL de solution à précipiter sont ajoutés à tous les tubes sauf aux tubes pour la détermination de la radioactivité totale. Le tout est agité et incubé 20 minutes à 4°C. Les tubes sont ensuite centrifugés (2000-3000g) pendant 15 minutes. Les surnageants sont rejetés et les culots sont lus au compteur gamma.

### **2.2.5 Évaluation de la triglycéridémie**

La détermination des triglycérides du sérum est obtenue grâce à la méthode de la glycérol phosphate oxydase (GPO; ThermoDMA, TX, USA). Voici une brève explication du principe; les échantillons plasmatiques sont mis en présence de lipase. L'hydrolyse des triglycérides par cette dernière enzyme génère des acides gras libres ainsi que du glycérol. Le glycérol est ensuite phosphorylé par l'adénosine-5'-triphosphatase en présence de la glycérol kinase, ce qui a pour résultante de former du glycérol-3-phosphate qui sera ensuite oxydé par la glycérol phosphate oxydase. Cette dernière étape libère du dihydroxyacétone phosphate et du peroxyde d'hydrogène, qui, en présence de peroxydase oxyde le 4-aminoantipyrine et d'acide sulfonique 2-hydroxy-3,5-dichlorobenzène (HDBS) forme un chromogène rouge qui est directement proportionnel à la concentration de triglycérides et de glycérol libre dans le sérum. Brièvement, 10 µL d'échantillon (sérum) ou de standard (Courbe standard 0-250 mg/dL) sont ajoutés à 1 mL de réactif GPO en duplicata. Après une incubation de 6 minutes à la température de la pièce, les tubes sont lus à l'aide d'un spectrophotomètre (510 nm).

## **2.3 Méthodologie expérimentale**

### **2.3.1 Essais pharmacologiques *ex vivo***

Immédiatement après le sacrifice de l'animal, les tissus à l'essai à savoir les carotides communes et l'aorte thoracique (partie comprenant 4 cm en amont du diaphragme et excluant

la crosse aortique), sont disséqués *in situ*, prélevés et immergés dans une solution physiologique. Les tissus seront coupés en anneaux de 3-5 mm. Ils sont ensuite installés dans des bains d'organes isolés de 10 mL contenant une solution physiologique de Krebs dont la composition est la suivante; NaCl 118.1 mM, KCl 4.7 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.18 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25.0 mM et D-glucose 5.5 mM. Cette solution est oxygénée (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) et maintenue à 37°C tout le long de l'expérience. Les anneaux sont soumis à une tension initiale de 1.0 g qui sera réajustée toutes les vingt minutes (si nécessaire) lors des lavages. Les tissus sont ainsi équilibrés pendant 60-90 minutes avant le début des protocoles. Les contractions isométriques ainsi que les variations de tension des tissus sont enregistrées grâce à un transducteur relié à un physiographe (Grass, FT03; Polygraph 7D Grass Instrument Co., Quincy, Massachusetts). Pour chaque expérience, des courbes concentration-réponse d'un même agoniste seront faites sur un ou plusieurs anneaux différents provenant du même animal. Dans le cas où plusieurs anneaux auront été utilisés avec un même agoniste, la moyenne des résultats sera faite de façon à attribuer une valeur pour l'animal. Le pEC<sub>50</sub> généré par cette expérience sera celui d'un animal et comptera pour 1 (n=1). Un résultats décrit comme étant n=7 veut donc dire que la moyenne provient de 7 animaux différents.

### 2.3.2 Évaluation de la relaxation endothélium-dépendante

Pour l'étude de la relaxation endothélium-dépendante, les tissus sont montés dans les bains avec grande minutie pour éviter d'endommager les cellules endothéliales. À la suite du montage, l'intégrité de l'endothélium est évaluée. Pour se faire, les tissus sont contractés avec la phényléphrine (10<sup>-7</sup> M) et une dose d'acétylcholine (ACh; 10<sup>-6</sup> M) est injectée sur le plateau de la contraction. Une relaxation presque complète (>75%) du tissu confirmera que l'endothélium est bel et bien fonctionnel. Un temps de repos de 60 minutes est ensuite alloué aux tissus avant de commencer les courbes concentration-réponse (CCR) cumulatives à l'ACh (1x10<sup>-9</sup>-1x10<sup>-5</sup> M) ou aux kinines (1x10<sup>-9</sup>-1x10<sup>-5</sup> M) sur des tissus pré-contractés à la phényléphrine (10<sup>-7</sup> M et 5x10<sup>-8</sup> M respectivement). Les agonistes kininergiques pour cette étude seront les agonistes du récepteur B<sub>2</sub> : la bradykinine (BK), la kallidine (KD) et la

Phe<sup>8</sup>(CH<sub>2</sub>-NH)Arg<sup>9</sup>BK et d'autre part, les agonistes du récepteur B<sub>1</sub>, soit la desArg<sup>9</sup>bradykinine (DBK), la LysdesArg<sup>9</sup>bradykinine (LDBK) et la Sar[D-Phe<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>BK. Lors de l'utilisation de ces analogues, nous ajoutons du captopril (inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I-kininase II; 10<sup>-6</sup> M) à la solution physiologique de Krebs. La relaxation des aortes et des carotides du groupe contrôle sont comparée à la relaxation des aortes et des carotides du groupe nourris au fructose.

La relaxation endothélium-dépendante est reconnue pour libérer différents vasorelaxants. La littérature rapporte entre autre que l'aorte de rat peut, en présence d'inhibiteur de NOS et de COX, relâcher un agent vasodilatateur reconnu comme étant le facteur relaxant hyperpolarisant de l'endothélium (EDHF; CHEN *et al.*, 1988; HATAKE *et al.*, 1995). La fonction potentielle de cet agent a été évalué en mesurant des CCR à l'ACh (1X10<sup>-9</sup>-1X10<sup>-5</sup> M) en absence et en présence d'inhibiteurs sur l'aorte et l'artère carotide. Les inhibiteurs utilisés sont : le N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine (L-NNA, 10<sup>-4</sup> M), un inhibiteur de la NOS et l'indométhacine (10<sup>-6</sup> M) un inhibiteur de la COX. Puisque l'incubation des tissus en présence L-NNA mène à une plus forte contraction, les tissus sont alors pré-contractés avec une dose plus faible de phényléphrine (10<sup>-9</sup>-10<sup>-8</sup> M) afin de générer une contraction de même amplitude que sans inhibiteurs. Nous allons utiliser également le chlorure de potassium (KCl, 20-60 mM) pour contracter la carotide de rat. Le KCl provoque une surcharge potassique extracellulaire menant à des contractions égales à celles générées avec la phényléphrine. Des CCR sont premièrement générées sur les tissus en absence d'inhibiteurs. Après cette première CCR, les tissus sont maintenus au repos pour une période de 60-90 minutes. Pendant ce repos, les tissus sont fréquemment rincés. Les inhibiteurs seront mis en présence des tissus 30-45 minutes avant de générer la seconde CCR. Des tissus témoins n'ayant pas été traités avec les inhibiteurs seront étudiés en parallèle. Ceci nous permet de vérifier si la seconde CCR à l'ACh relaxe également à la première. On s'assure aussi qu'il n'y est pas de désensibilisation des tissus suite à des CCR répétées. Le profil de la relaxation obtenu en présence d'inhibiteur avec les tissus provenant du groupe contrôle sera comparé à celui provenant du groupe nourri au fructose.

La relaxation persistante au traitement au L-NNA et à l'indométhacine (relaxation résiduelle) chez la carotide sera étudiée davantage afin d'avoir plus de renseignement sur la nature de cette relaxation. Nous utiliserons : la glyburide (10  $\mu$ M) un inhibiteur des canaux potassiques ATP dépendant, l'ibériotoxine (Ibtx; 20 nM), un inhibiteur des canaux potassiques calcium dépendant de type  $Bk_{Ca}$ , la charybdotoxine (Ctx; 50 nM) un bloqueur des canaux potassiques calcium dépendant de type  $Ik_{Ca}$  et  $Bk_{Ca}$ , l'apamine (500 nM), un bloqueur des canaux potassiques calcium dépendant de type  $Sk_{Ca}$ . Pour l'étude conceptuelle, toutes les CCR sont faites en présence de L-NNA ( $10^{-4}$  M) et d'indométhacine ( $10^{-6}$  M). Les différents bloqueurs sont ajoutés dans les bains 20-30 minutes avant le début de la CCR. Un délai de 60-90 minutes est alloué entre la première CCR à l'ACh (contrôle-inhibiteur) et la seconde (avec inhibiteurs+bloqueur(s)). Une attention particulière est mise à établir les amplitudes de contraction de la première et de la seconde CCR soit égale. Des tissus témoins n'ayant pas été traités avec les bloqueurs n'ont démontré aucun changement entre les réponses relaxantes observées dans la première et la seconde courbe concentration-réponse. L'effet relaxant est calculé pour chaque substance par le ratio de la relaxation sur l'amplitude de la contraction (relaxation agent relaxant (mm)/pré-contraction phényléphrine ou KCl (mm)) et exprimé en pourcentage.

### **2.3.3 Évaluation de la relaxation endothélium-indépendante**

Pour cette partie de l'étude les tissus sont utilisés sans endothélium. Pour ce faire, avant de fixer les tissus au crochet métallique, nous frottons délicatement, à l'aide d'une fine tige de métal, l'intérieur des artères en les gardant toujours humides dans le tampon physiologique. Pour vérifier si les vaisseaux sont bel et bien dénudés de leur endothélium, nous vérifions l'action de l'acétylcholine ( $10^{-6}$ M) sur les tissus pré-contractés à la phényléphrine ( $10^{-8}$ M). L'absence de relaxation confirme que l'endothélium n'est plus fonctionnel. Les tissus ayant conservé une réponse à l'Ach ne sont pas utilisés pour l'étude.

Pour l'étude de la relaxation endothélium-indépendante, les tissus contractés préalablement à l'aide de la phényléphrine ( $10^{-8}$  M) sont relaxés à l'aide de différents pharmacophores : le

salbutamol ( $4.2 \times 10^{-9}$ - $4.2 \times 10^{-5}$  M), l'adénosine ( $1 \times 10^{-8}$ - $1 \times 10^{-3}$  M), le sodium nitroprussiate (SNP,  $1 \times 10^{-11}$ - $1 \times 10^{-8}$  M), la forskoline ( $1 \times 10^{-9}$ - $1 \times 10^{-6}$  M), le 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX,  $1 \times 10^{-8}$ - $1 \times 10^{-5}$  M) et le pinacidil ( $1 \times 10^{-8}$ - $1 \times 10^{-5}$  M). Des CCR sont générées à l'aide de ces substances sur les tissus provenant des deux groupes d'animaux. L'effet relaxant sera calculé pour chaque substance par le ratio de la relaxation sur l'amplitude de la contraction.

#### **2.3.4 Évaluation des effets contractiles d'agonistes peptidiques et non-peptidiques**

Les tissus sont utilisés sans endothélium pour l'étude des réponses contractiles. La procédure décrite à la partie 2.3.3 sera également suivie dans cette partie de l'étude. Nous devons cependant spécifier que pour cette partie expérimentale, la partie de l'aorte utilisée est le 3 cm en aval de la crosse aortique. Pour s'assurer de la stabilité des tissus après la période d'équilibration, ceux-ci sont testés par des stimulations consécutives au chlorure de potassium (KCl; 60 mM) à intervalles de 20 minutes. Après chaque stimulation, les tissus sont rincés fréquemment. La stabilité sera jugée satisfaisante lorsque deux stimulations consécutives donneront une amplitude de contractions identiques.

Les effets myotropes contractiles des différents agents sont mesurés sur l'aorte et la carotide des rats provenant des deux groupes (contrôle et fructose). Le volume d'injection des substances utilisées pour l'étude varie entre 50 et 100  $\mu$ L. Des courbes concentration-réponse (CCR) sont générées par l'application de doses croissantes d'agoniste jusqu'à l'obtention d'un plateau. Deux CCR sont faites sur un même tissu. Pour s'assurer qu'il n'y ait pas de désensibilisation face à un agoniste, les CCR sont faites de façon croisée, i.e. que sur un même tissu une CCR est produite grâce à un agoniste (e.g. phényléphrine), après un temps de repos de 60 minutes, une seconde CCR sera générée, mais cette fois-ci avec un agoniste différent (e.g. urotensine-II). De cette façon, nous pouvons générer plus d'une CCR avec un même agoniste sur différents anneaux de tissu et éviter la désensibilisation de ceux-ci. Les substances sont appliquées aux concentrations suivantes; Uro-II de  $6.8 \times 10^{-11}$  à  $6.8 \times 10^{-6}$  M, ET-1 de  $1 \times 10^{-11}$  à  $1 \times 10^{-6}$  M, Ang II de  $1 \times 10^{-11}$  à  $1 \times 10^{-6}$  M, Phe de  $1 \times 10^{-9}$  à  $1 \times 10^{-5}$  M. Pour

vérifier la spécificité des contractions observées par ET-1 ( $10^{-8}$  M pour l'aorte et  $10^{-9}$  M pour la carotide), Ang II ( $10^{-8}$  M) et Phe ( $10^{-8}$  M), nous avons utilisé les antagonistes suivant; BQ-123 ( $10^{-6}$  M; antagoniste  $ET_A$ ), losartan ( $10^{-6}$  M; antagoniste  $AT_1$ ) et prazosin ( $10^{-6}$  M; antagoniste  $\alpha_1$ -adrénergique) respectivement. Ces antagonistes sont ajoutés 20-30 minutes avant l'ajout des agonistes à des concentrations submaximales.

## 2.4 Provenance des produits utilisés

La plupart des agents pharmacologiques utilisés pour ce travail ainsi que les sels nécessaires à la préparation du tampon physiologique (Krebs) ont été achetés chez Sigma-RBI (St-Louis, MO, USA) : hydrochlorure de prazosin (1-(4-amino-6,7-dimethoxy-2-quinazolinyl)-4-(2-furoyl) piperazine), pinacidil (( $\pm$ )-N-Cyano-N'-4-pyridinyl-N''-(1,2,2-trimethylpropyl)guanidine), forskoline (7 $\beta$ -Acetoxy-8,13-epoxy-1 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,9 $\alpha$ -trihydroxylab $\delta$ -14-en-11-one), salbutamol (Albuterol;  $\alpha$ -[(tert-Butylamino)methyl]-4-hydroxy-*m*-xylene- $\alpha,\alpha'$ -diol), nitroprussiate de sodium (SNP; nitroferrocyanure de sodium), indométhacine (acide 1-(4-Chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-3-indoleacétique),  $N_G$ -nitro-L-arginine (L-NNA; acide N<sup>5</sup>-(Nitroamidino)-L-2,5-diaminopentanoïque), angiotensine II (Ang II humaine; Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe), glyburide (glibenclamide; 5-chloro-N-[4-(cyclohexylureidosulfonyl)phenethyl]-2-methoxy-benzamide), acétylcholine, adénosine, phényléphrine ((R)-(-)-1-(3-Hydroxyphenyl)-2-methylaminoethanol hydrochlorure).

L'apamine, la charybdotoxine et l'ibériotoxine proviennent de Calbiochem (San Diego, CA, USA) alors que l'urotensine-II (Uro-II), les agonistes kininergiques et le BQ-123 (Cyclo(D-Asp-Pro-D-Val-Leu-D-Trp)) ont été synthétisés en phase solide dans notre laboratoire. L'endothéline-1 (1-21) a été achetée chez American Peptide. Le losartan est une générosité du laboratoire du Dr Emmanuel Escher.

#### **2.4.1 Solubilisation des agents pharmacologiques**

Les agonistes peptidiques (AngII, Uro-II, ET-1, agonistes kininergiques, BQ-123) et certains non-peptidiques (phényléphrine, acétylcholine, salbutamol, SNP, L-NNA) ont été solubilisés dans l'eau distillée. Des solutions de 1-10 mg/mL furent préparées et conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$ . L'indométhacine fut solubilisée dans le tampon basique Trizma (0.02 M) alors que l'adénosine fut solubilisé dans le NaOH (0.1 N). Pour les substances solubilisées dans le sulfoxyde de diméthyl (DMSO; gliburide, pinacidil, IBMX, forskoline), des solutions stocks ayant la concentration maximale suggérée par le fabricant ont été faites de façon à ce que la concentration finale de DMSO n'excède pas 1% dans le bain d'organe (2 mg/mL, 25 mg/mL, 2 mg/mL et 5 mg/mL respectivement). Des solutions fraîches furent préparées quotidiennement pour ces substances. Les dilutions ont été ensuite préparées dans une solution saline de NaCl (0.9% p/v) avant d'être injecté dans le bain.

#### **2.5 Paramètres pharmacologiques-Affinité apparente des agonistes**

La terminologie pharmacologique employée dans cette thèse est en accord avec IUPHAR (International Union of Pharmacology; NEUBIG *et al.*, 2003). La puissance d'un agoniste ou  $pEC_{50}$  ( $pD_2$ ) est exprimée par la valeur logarithmique négative ( $-\text{Log}_{10}$ ) de la concentration molaire d'agoniste produisant 50% de l'effet maximal ( $E_{\text{max}}$ ). L'effet maximal relaxant est exprimé en pourcentage de la réduction de la contraction obtenue par la phényléphrine ( $10^{-7}$ - $10^{-8}$  M) ou KCL (20 mM). L'effet maximal contractile est exprimé quant à lui en grammes de tension produite par une concentration supramaximale des différents agonistes utilisés. Le terme supramaximal indique qu'un agent pharmacologique est utilisé à une concentration 5 à 10 fois supérieure à la concentration nécessaire pour obtenir l'effet maximal.

## **2.6 Évaluation statistique des données**

Les données sont présentées sous formes de moyenne  $\pm$  erreur standard. Les différences entre les groupes ont été analysées à l'aide du test *t* de Student pour données non-pairées. Les valeurs de probabilité (p) inférieures ou égales à 0.05 furent considérées comme significatives. Le nombre n représente le nombre différent d'animaux utilisés pour chaque paramètre rapporté



## Résultats

### 3.1 Paramètres physiologiques des animaux

Tel qu'indiqué au Tableau 2, la pression artérielle des rats nourris au fructose était significativement plus élevée que celle des rats contrôles. La pression systolique était de  $153.1 \pm 2.1$  mm Hg pour les animaux nourris au fructose et de  $129.1 \pm 6.4$  mm Hg ( $p < 0.002$ ) pour le groupe contrôle. La pression diastolique, bien que plus élevée chez les rats nourris au fructose, était toutefois non significativement différente ( $84.4 \pm 2.5$  mm Hg vs  $79 \pm 5.8$  mm Hg; fructose vs contrôle,  $p > 0.05$ )

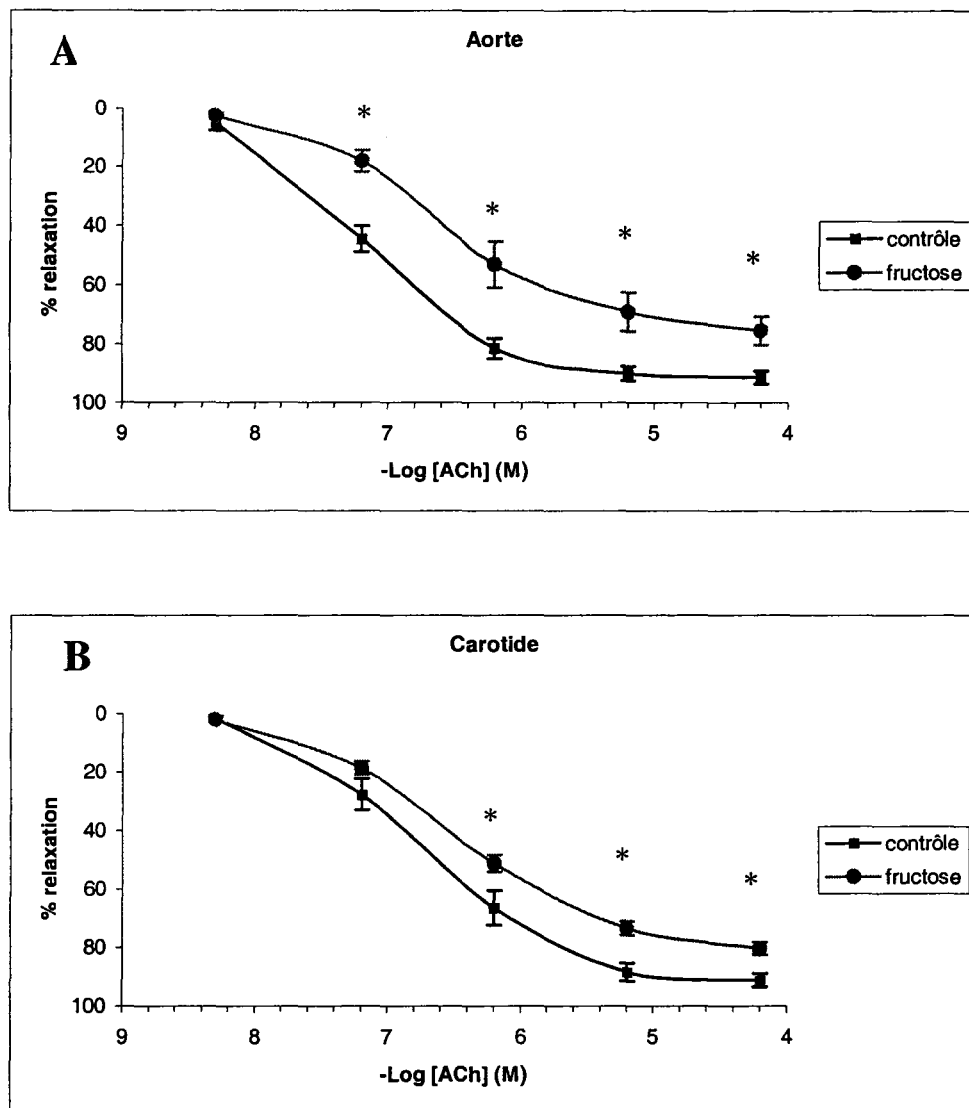
Le poids des animaux nourris au fructose n'est pas différent de celui des animaux sous la diète normale ( $427 \pm 10$  g vs  $441 \pm 9$  g, respectivement). Les rats insulino-résistants démontrent cependant une triglycéridémie ( $12.3 \pm 2.0$  mmol/L vs  $1.6 \pm 0.4$  mmol/L,  $p < 0.01$ ) et une insuliniémie ( $223 \pm 23$  pmol/L vs  $138 \pm 27$  pmol/L;  $p < 0.03$ ) plus élevées comparativement aux rats contrôles. Ceci est tout à fait en accord avec la littérature (HWANG *et al.*, 1987; REAVEN et CHANG, 1991) et confirme un profil métabolique de résistance à l'insuline. La glycémie non à jeun est également plus élevée chez les rats fructosés ( $11.7 \pm 0.5$  mmol/L vs  $8.3 \pm 0.4$  mmol/L;  $p < 0.01$ ) suggérant une intolérance au glucose. L'élévation de la glycémie après quatre semaines de diète au fructose a été rapportée précédemment par notre groupe (CHAKIR *et al.*, 1998) et est probablement en relation avec le fait que les animaux ont été étudiés après un bref jeûne d'en moyenne 4-5 heures.

	Contrôle n=28	Fructose n=48	Valeur p
Poids (g)	441±9	427±10	NS
Pression artérielle (mm Hg)			
Pression moyenne	96±6	112±2	<0.05
Systolique	129±6	153±2	<0.002
Diastolique	79±6	84±3	NS
Triglycérides (mmol/L)	1.6±0.4	12.3±2.0	<0.01
Insuline (pmol/L)	138±27	223±23	<0.03
Glucose (mmol/L)	8.3±0.4	11.7±0.5	<0.01

**TABLEAU 2 Paramètres physiologiques des animaux. Moyenne±erreur standard. NS : non significatif (p >0.05) test t-Student.**

### 3.2 Relaxation endothélium-dépendante de l'aorte et de la carotide

L'acétylcholine (ACh) cause une relaxation du muscle vasculaire lisse en stimulant la relâche d'un facteur endothélium-dépendant dans une variété de vaisseaux sanguins (FURCHGOTT et ZAWADZKI, 1980). L'application d'ACh sur les aortes et les carotides ayant conservés leur endothélium nous permet d'observer des relaxations dose-dépendantes (FIGURE 5). La comparaison des courbe concentration-réponse (CCR) à l'ACh ( $5.5 \times 10^{-9}$ - $5.5 \times 10^{-5}$  M) entre le groupe contrôle et le groupe nourri au fructose dévoile une diminution de relaxation endothélium-dépendante dans les aortes ainsi que les carotides des rats nourris au fructose. Dans l'aorte, la relaxation maximale ( $E_{\max}$ ) des animaux contrôles est de

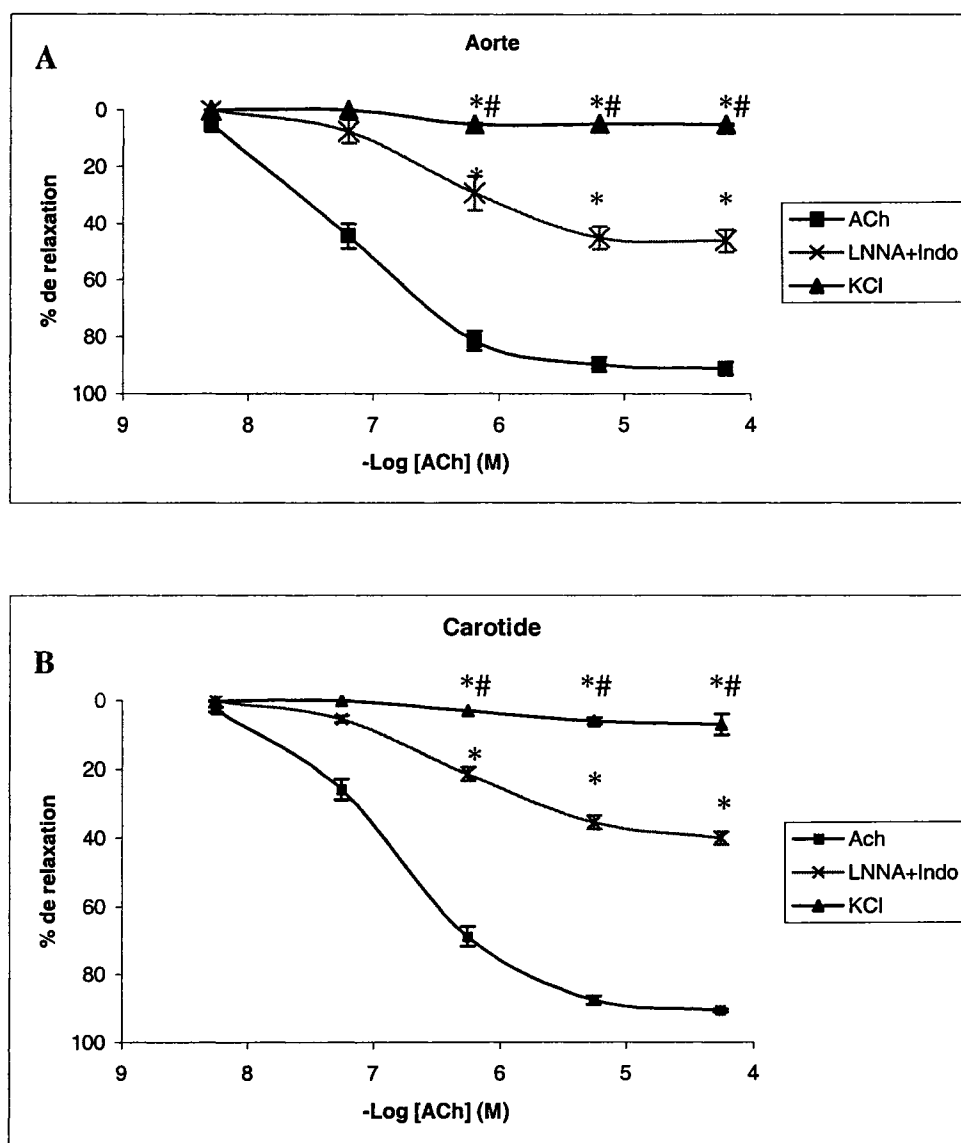


**FIGURE 5** Courbes concentration-réponses cumulatives à l'ACh ( $5.5 \times 10^{-9}$ - $5.5 \times 10^{-5}$  M) sur l'aorte (A) et la carotide (B) de rats contrôles (■; n=10) et de rats nourris au fructose (●; n=10) ayant conservé leur endothélium, et contractées par la phényléphrine ( $10^{-8}$  M). Chaque point représente la moyenne et l'erreur standard. \*p<0.05

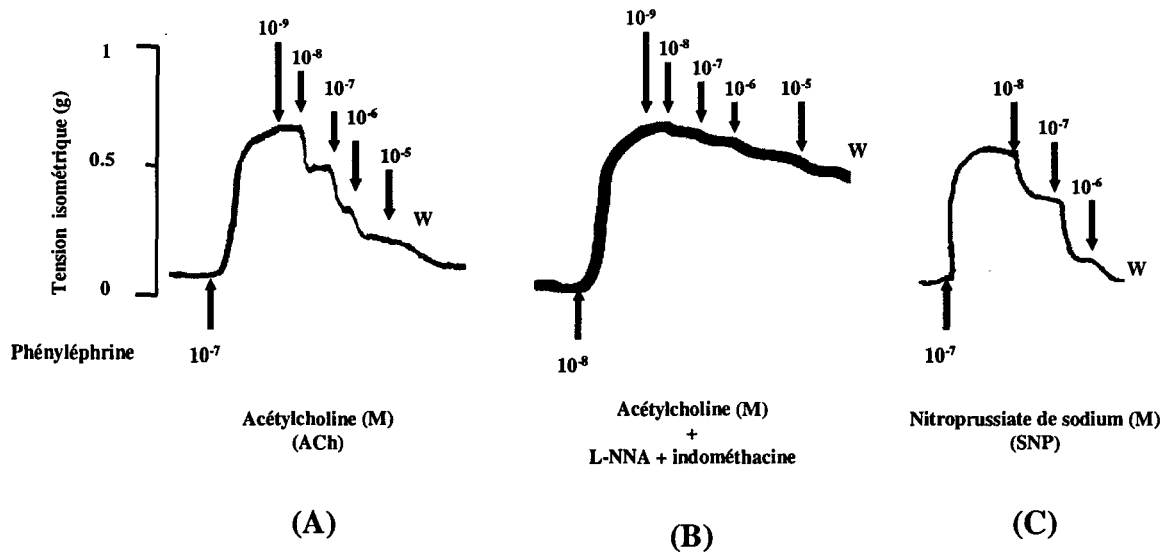
91.2±2.1% comparativement à 75.4±4.8% pour celle des animaux nourris au fructose (p<0.02). L'affinité apparente de l'ACh diminue également chez les rats fructosés : le pEC<sub>50</sub> chez ces animaux est de 6.31±0.11 alors que celui des animaux contrôles est de 7.08±0.18 (p<0.01).

Dans la carotide, la relaxation maximale des rats contrôles est de 91.2±2.3% alors que celle des rats nourris au fructose est de 80.4±2.1% (p<0.01). On observe également dans cette préparation une diminution du pEC<sub>50</sub> chez les rats nourris au fructose (6.21±0.06 vs 6.60±0.12; p<0.01; fructose vs contrôle). Notre modèle animal démontre donc une perte de relaxation endothélium dépendante sur deux préparations artérielles différentes.

Comme la relaxation endothélium dépendante de la carotide peut être fonction de plusieurs facteurs vasorelaxants, nous avons étudié la relaxation résiduelle après traitement au L-NNA (10<sup>-4</sup> M) et à l'indométhacine (10<sup>-6</sup> M) (FIGURE 6). Tel qu'attendu, la relaxation de l'ACh en présence de ces deux inhibiteurs (tissus pré-contractés à la phényléphrine 10<sup>-9</sup>-10<sup>-8</sup> M), diminue de façon importante. En effet, la relaxation maximale observée dans ces conditions est de 39.9±2.0% comparé à 90.5±0.5% pour la relaxation sans inhibiteurs. La relaxation à l'ACh sans inhibiteurs mène à des relaxations franches et rapides, tout comme le SNP, alors qu'en présence d'inhibiteur, les relaxations sont lentes et moins prononcées (FIGURE 7). Lorsque nous utilisons le KCl (20 mM) pour contracter les tissus (à une amplitude semblable à celle obtenue avec la phényléphrine), la relaxation résiduelle est presque abolie. Une surcharge potassique à l'extérieure des cellules a pour effet de bloquer les canaux potassiques et de court-circuiter les voies de signalisation qui utilisent ces canaux. Ceci suggère donc que la relaxation des vaisseaux à l'ACh en présence d'inhibiteurs implique des canaux potassiques dans le mécanisme d'action du facteur libéré par les cellules endothéliales dans ces conditions inhibitrices. Ce résultat indique qu'en plus du NO et des prostanoïdes, l'ACh stimule la libération d'un facteur endothéliale correspondant à l'EDHF (GARLAND *et al.*, 1995). Il est à noter que les tissus sans endothélium ne répondent pas à l'ACh (résultat non montré).

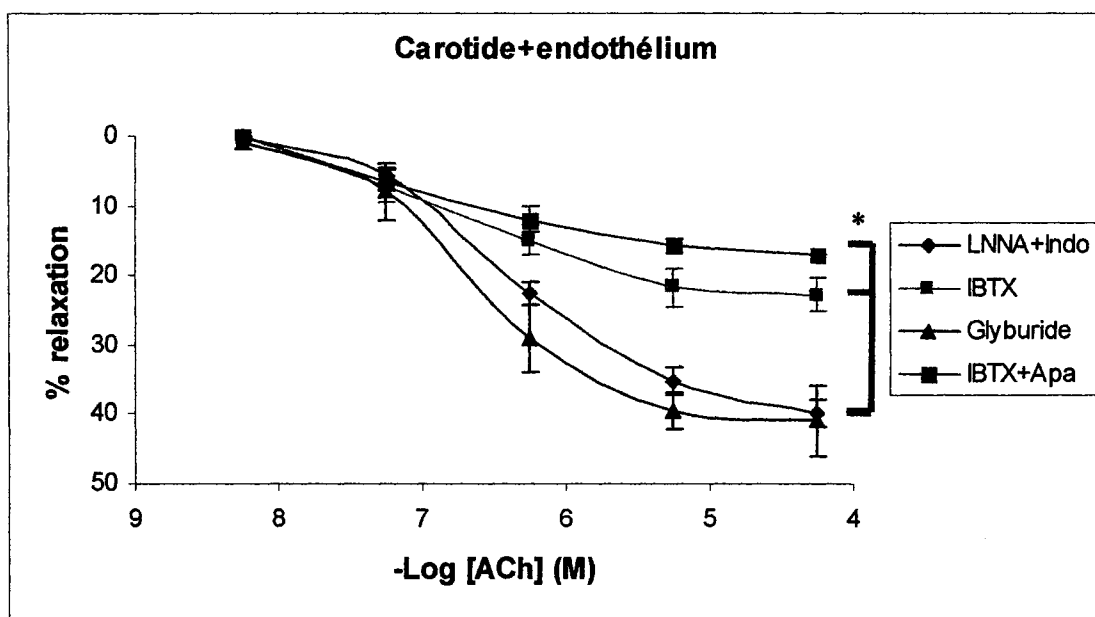


**FIGURE 6** Courbes concentration-réponses cumulatives à l'ACh ( $5.5 \times 10^{-9}$ - $5.5 \times 10^{-5}$  M) sur l'aorte (A) et la carotide (B) de rats normaux avec endothélium pré-contractionnées par la phényléphrine ( $10^{-7}$  M ; ■,  $10^{-8}$  M; X n=9) ou par le KCl (20 mM; ▲ n=3). Relaxations à l'ACh obtenues en absence (■; n=9) ou en présence de L-NNA et d'indométhacine ( $10^{-4}$  et  $10^{-6}$  M respectivement; X▲). Chaque point représente la moyenne et l'erreur standard. \*p<0.001 lorsque la courbe contrôle (ACh sans inhibiteurs; ■) est comparée aux courbes contractionnées par KCl (▲) et phényléphrine (X) en présence d'inhibiteurs. #p<0.05 lorsque la courbe avec inhibiteurs (X) est comparée à la courbe contractionnée par KCl (▲).



**FIGURE 7** Tracés types de relaxation à l'acétylcholine sur une aorte de rat avec endothélium en absence (A) ou en présence (B) de L-NNA ( $10^{-4}$  M) et d'indométhacine ( $10^{-6}$  M) ou relaxée au nitroprussiate de sodium (C). Les inhibiteurs, L-NNA et indométhacine, n'affectent pas la relaxation au SNP (résultat non-montré).

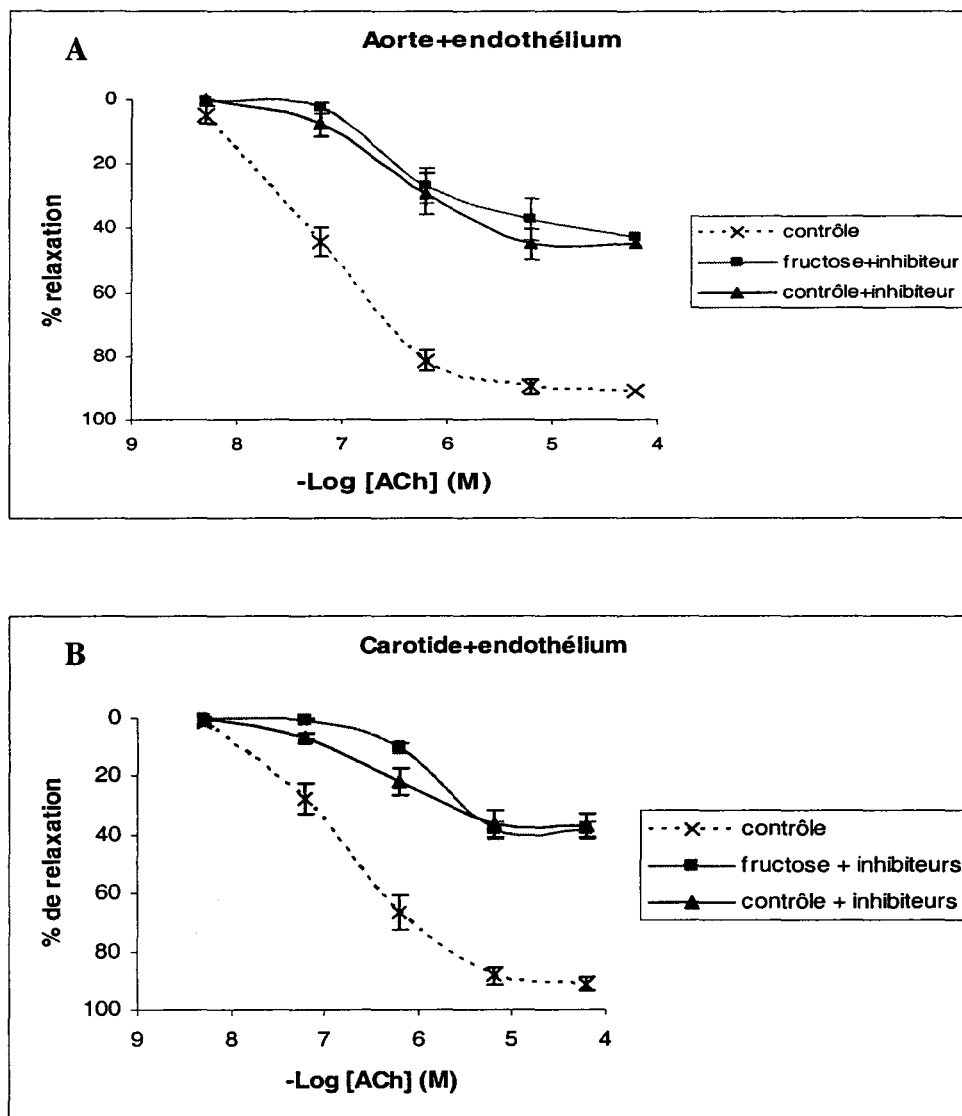
Puisque nous suspicions l'implication des canaux potassiques dans la relaxation résiduelle suite au traitement à L-NNA et à l'indométhacine, nous avons poussé notre expérimentation plus loin en utilisant des molécules reconnues pour leur effets sur ce type de canaux (FIGURE 8). En plus d'incuber les tissus en présence d'inhibiteurs (L-NNA et de l'indométhacine), les tissus ont été mis en présence de glyburide (10  $\mu$ M), ibériotoxine (20 nM), charybdotoxine (50 nM) et d'apamine (500 nM). La relaxation résiduelle à l'ACh n'est pas touchée par l'inhibiteur des canaux potassiques ATP dépendant (glyburide). Elle est cependant diminuée de moitié lorsque nous appliquons l'ibériotoxine ( $24.4 \pm 3\%$ ), qui est un bloqueur des canaux potassiques à large conductance ( $BK_{Ca}$ ). Ceci suggère donc l'implication de ces canaux dans le mécanisme d'action de la relaxation résiduelle indépendante du NO ou des prostanoïdes. L'application simultanée de l'apamine, un inhibiteur de canaux potassique calcium-dépendant de petite conductance ( $SK_{Ca}$ ), à l'ibériotoxine inhibe à peine plus la relaxation de l'ACh persistante au traitement des inhibiteurs. L'application de la charybdotoxine dans les bains contenant les anneaux de carotide provoque une activité spontanée irréversible dans cette préparation, ce qui n'était pas observé avec l'ibériotoxine (IbTX). Il est donc impossible pour nous d'utiliser cet agent pharmacologique pour caractériser la carotide. Nous pouvons cependant affirmer que les canaux potassiques à large conductance ( $BK_{Ca}$ ) sont impliqués dans ce mécanisme de relaxation. Ce mécanisme emploie possiblement d'autres types de canaux, soient insensibles à l'apamine/IbTX ou de classes différentes.



**FIGURE 8** Courbes concentration-réponses cumulatives à l'ACh ( $5.5 \times 10^{-9}$  à  $5.5 \times 10^{-5}$  M) obtenues en présence de L-NNA ( $10^{-4}$  M) et d'indométhacine ( $10^{-6}$  M) sur la carotide, de rats normaux, avec endothélium et pré-contractée par la phényléphrine ( $10^{-8}$  M). Relaxations en absence (♦; n=7) ou en présence de bloqueurs de canaux potassiques : glyburide (10  $\mu$ M, ▲ n=3), IbTX (20 nM, ■ n=8) ou de l'application simultanée d'IbTX et d'apamine (20 nM, 500 nM respectivement, ■ n=5). Chaque point représente la moyenne et l'erreur standard. \*p<0.001 lorsque nous comparons l'effet maximal avec inhibiteur (♦) avec soit la courbe IbTX (■) ou soit la courbe IbTX+apamine (■).

Nous avons ensuite comparé la relaxation résiduelle à l'ACh suite au traitement au L-NNA-indométhacine entre les tissus provenant de rat contrôle et de rat nourri au fructose (FIGURE 9). Nous n'avons pas observé de différences significatives entre les deux profils de relaxation dans l'aorte ( $E_{\max}$ ;  $45.0 \pm 4.7\%$  vs  $33.3 \pm 6.3$ ,  $p > 0.05$ ; contrôle vs fructose). Dans la carotide, on peut voir un léger décalage des courbes des animaux nourris au fructose aux faibles doses d'ACh alors que le  $E_{\max}$  demeure identique à celui des rats contrôles ( $38.4 \pm 3.0\%$  vs  $37.0 \pm 4.0\%$ ,  $p > 0.05$ ; fructose vs contrôle).



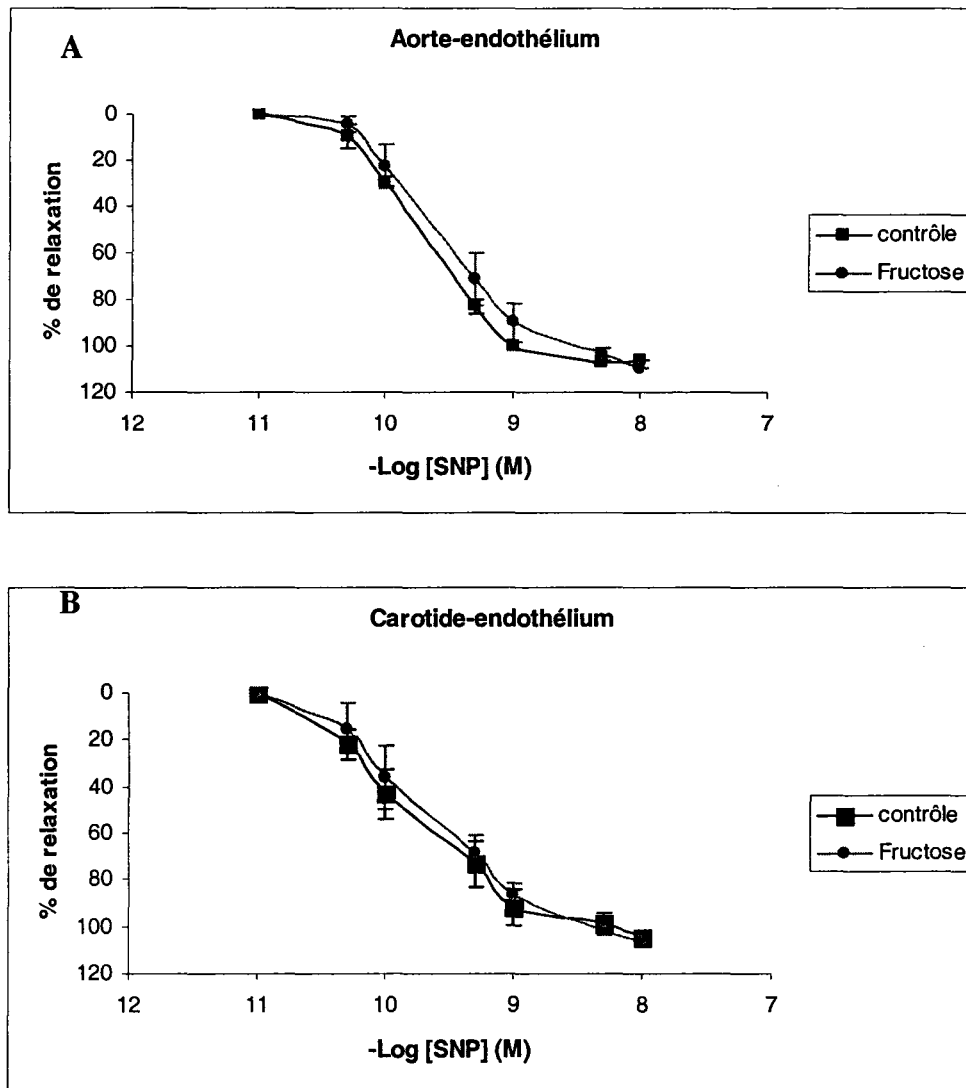


**FIGURE 9** Courbes concentration-réponses cumulatives à l'ACh ( $5.5 \times 10^{-9}$ - $5.5 \times 10^{-5}$  M) obtenues en absence (-X-; n=9) ou en présence d'inhibiteur (L-NNA  $10^{-4}$  M et indométhacine  $10^{-6}$  M; ▲■) sur l'aorte (A) et la carotide (B). Les tissus ont conservés leur endothélium et sont contractées par la phényléphrine (-x-  $10^{-7}$  M et ▲■  $10^{-8}$  M). Comparaison de la réponse du groupe normal (-x- ▲) à celle du groupe nourri au fructose (■). Chaque point représente la moyenne et l'erreur standard.

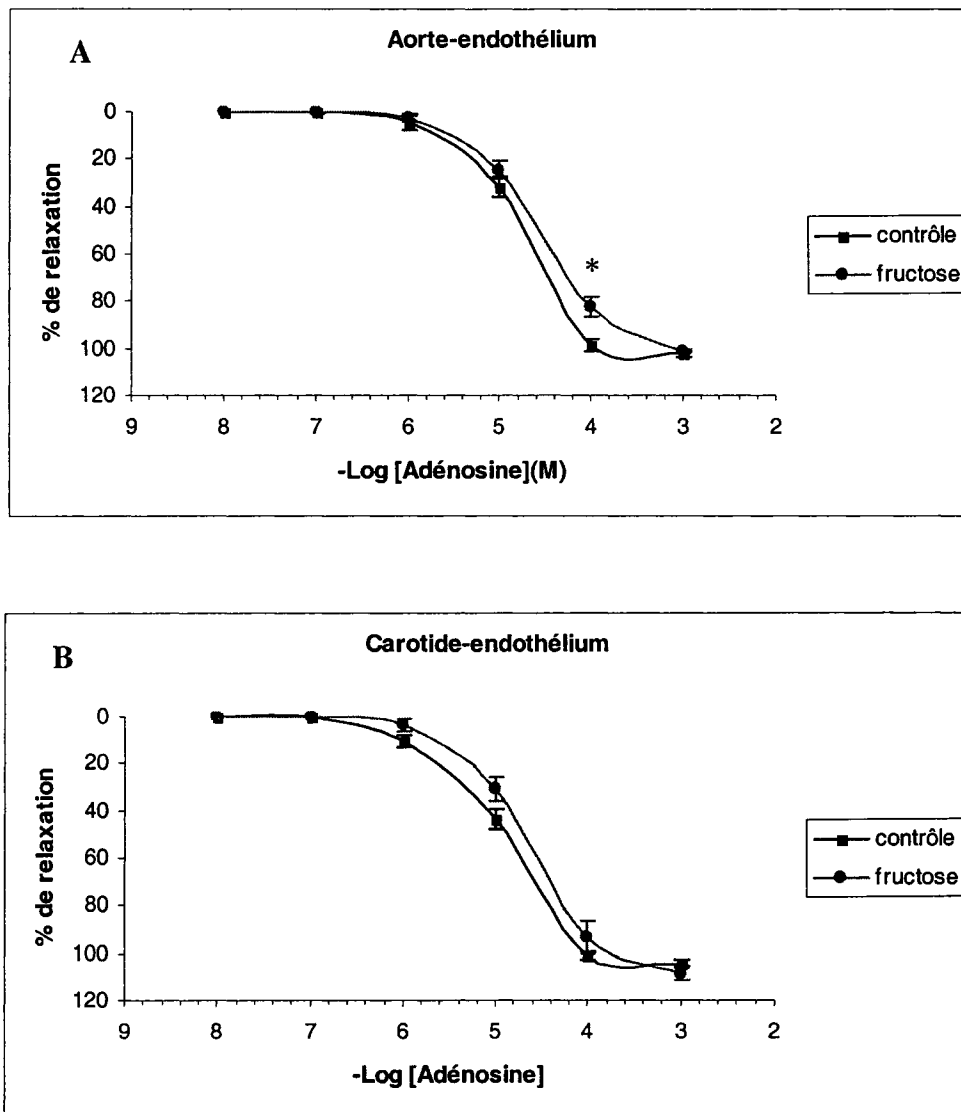
### 3.3 Relaxation endothélium-indépendante de l'aorte et de la carotide

La perte de relaxation endothélium-dépendante à l'acétylcholine observée dans l'aorte et la carotide de rat insulino-résistant (FIGURE 5) laisse entrevoir un mal fonctionnement des cellules endothéliales dans ces deux artères. Cependant, est-ce que l'intégrité du muscle lisse vasculaire demeure intacte dans le modèle de résistance à l'insuline du rat nourri au fructose? Pour répondre à cette question, nous avons utilisé le nitroprussiate de sodium (SNP) sur des préparations dénudées de leur endothélium. Le SNP provoque des relaxations dose-dépendantes dans les deux préparations (FIGURE 10). Le SNP est un donneur de NO qui permet de stimuler la guanylate cyclase et initier les mécanismes nécessaires à la relaxation du muscle lisse. Ceci nous a donc permis d'évaluer le fonctionnement du muscle lisse entre les deux groupes d'animaux. Sur les deux préparations utilisées, nous observons des profils de relaxation identiques ( $E_{\max}$  :  $106 \pm 0.6\%$  vs  $109 \pm 0.2\%$ , contrôle vs fructose, FIGURE 9,  $p > 0.05$ ). Au niveau de la carotide, les relaxations maximales sont également semblables;  $105 \pm 2.2\%$  pour les contrôles et de  $107 \pm 0.2\%$  pour les rats nourris au fructose ( $p > 0.05$ ). Ceci révèle que la voie de signalisation de NO est bien fonctionnelle dans le muscle lisse des animaux résistants à l'insuline. Ceci pointe donc vers un problème au niveau de la cellule endothéliale pour expliquer la diminution de la relaxation en réponse à l'ACh dans le vaisseau intact chez le rat nourri au fructose (FIGURE 5). Ce dernier résultat ne nous confirme cependant pas que toutes les voies de signalisation pouvant mener à la relaxation de muscle lisse vasculaire sont intactes en présence de résistance à l'insuline. Ces informations ne font que nous informer que la voie de signalisation du NO est fonctionnelle et qu'elle permet au muscle lisse de se relaxer adéquatement.

Qu'en est-il des autres voies de signalisation du muscle lisse stimulées par différents vasorelaxants? Pour approfondir nos connaissances et tester notre hypothèse, nous avons utilisé l'adénosine. Ce nucléoside est reconnu pour a) agir via des récepteurs couplés au protéine G ( $A_{2a}/A_{2b}$ ), b) activer l'adénylate cyclase et produire un effet relaxant du muscle lisse (OLSSON et PEARSON, 1990). Nous avons donc construit des CCR à l'adénosine ( $1 \times 10^{-8}$ - $1 \times 10^{-3}$  M) pour étudier davantage le fonctionnement du muscle lisse dans un



**FIGURE 10** Courbes concentration-réponses cumulatives obtenue avec le SNP ( $1 \times 10^{-11}$ - $1 \times 10^{-8}$  M) sur l'aorte (A) et la carotide (B) de rats contrôles (■; n=10) et de rats nourris au fructose (●; n=10). Les tissus sont dénudés de leur endothélium et préalablement contractés par la phényléphrine ( $10^{-8}$  M). Chaque point représente la moyenne et l'erreur standard.

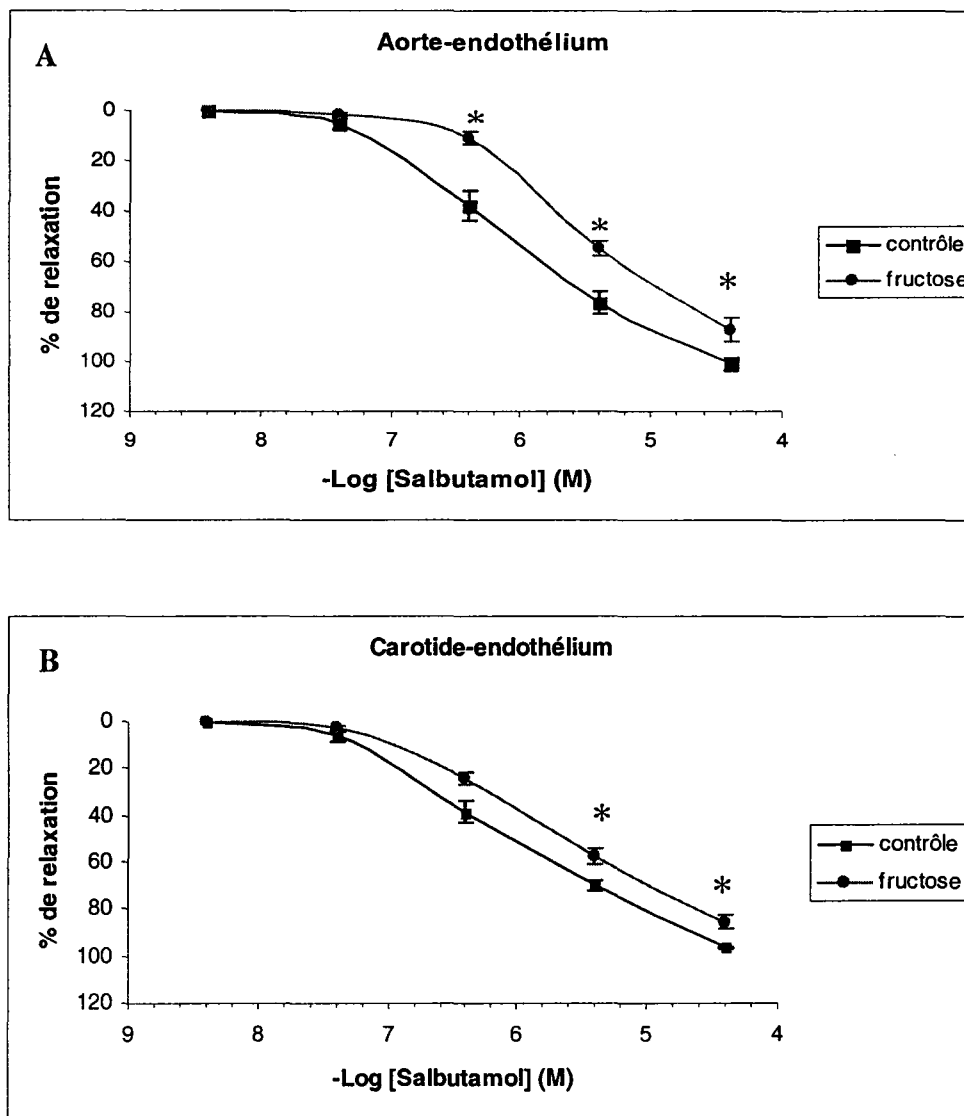


**FIGURE 11** Courbes concentration-réponses cumulatives obtenues avec adénosine ( $1 \times 10^{-8}$ - $1 \times 10^{-3}$  M) sur l'aorte (A) et la carotide (B) de rats contrôles (■; n=7) et de rats nourris au fructose (●; n=12). Les tissus sont dénudés de leur endothélium et préalablement contractés par la phényléphrine ( $10^{-8}$  M). Chaque point représente la moyenne et l'erreur standard. \*p<0.05.

contexte de résistance à l'insuline (FIGURE 11). Dans l'aorte, le profile des courbes demeurent similaires entre les deux groupes et les différences observées ne touche qu'un seul point. La relaxation maximale est de  $102 \pm 1.0\%$  et de  $101 \pm 0.6\%$  et les  $pEC_{50}$  de  $4.71 \pm 0.11$  et  $4.52 \pm 0.10$  pour les animaux contrôles et ceux nourris au fructose respectivement.

La relaxation maximale de la carotide est de  $104.2 \pm 1.3\%$  chez le groupe contrôle et de  $109.0 \pm 2.7\%$  chez le groupe résistant à l'insuline. L'affinité de l'adénosine ne varie pas de façon significative. Nous avons observé des  $pEC_{50}$  de  $4.93 \pm 0.18$  et de  $4.61 \pm 0.13$  ( $p > 0.05$ ) respectivement pour les rats contrôles et les rats nourris au fructose.

Nous avons poussé plus loin l'étude de la réactivité vasculaire en utilisant le salbutamol, un agoniste sélectif des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques des catécholamines, et reconnu pour ses effets vasorelaxants sur le muscle lisse vasculaire et intestinal (JANUARY *et al.*, 1998). Nous avons produit des CCR au salbutamol ( $4.2 \times 10^{-9}$ - $4.2 \times 10^{-5}$  M) sur les deux préparations. La FIGURE 12 nous permet d'apprécier des relaxations dose-dépendantes au salbutamol dans les deux préparations utilisées. La comparaison des courbes du groupe contrôle et du groupe résistant à l'insuline nous permet d'observer dans l'aorte de ces derniers une perte d'affinité au salbutamol. En effet, la courbe des animaux insulino-résistants est déplacée vers la droite et ceci mène à une diminution du  $pEC_{50}$  à  $5.62 \pm 0.11$  comparativement à  $6.14 \pm 0.09$  chez les animaux contrôles ( $p < 0.05$ ). La relaxation maximale entre les deux groupes est également différente de façon significative;  $101.0 \pm 2.8\%$  vs  $87.5 \pm 4.9\%$  ( $p = 0.04$ ) pour les rats contrôles et rats fructosés respectivement. Nous observons donc une perte de relaxation du muscle lisse vasculaire dans l'aorte des rats insulino-résistants/hypertendus. Cette perte d'affinité suggère l'existence de problèmes dans la voie de signalisation utilisée par le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique alors que la diminution de l'effet maximale laisse envisager une diminution du nombre de récepteurs bêta-adrénergiques. Nous observons ces mêmes différences dans la carotide. La courbe concentration-réponse des animaux nourris au fructose chez la carotide, est décalée plus discrètement que l'aorte.



**FIGURE 12** Courbes concentration-réponses cumulatives obtenues avec salbutamol ( $4,5 \times 10^{-8}$ – $4,5 \times 10^{-4}$  M) sur l'aorte (A) et la carotide (B) de rats contrôles (●; n=8) et de rats nourris au fructose (■; n=13). Les tissus sont dénudés de leur endothélium et préalablement contractés par la phényléphrine ( $10^{-8}$  M). Chaque point représente la moyenne et l'erreur standard. \*p<0.05

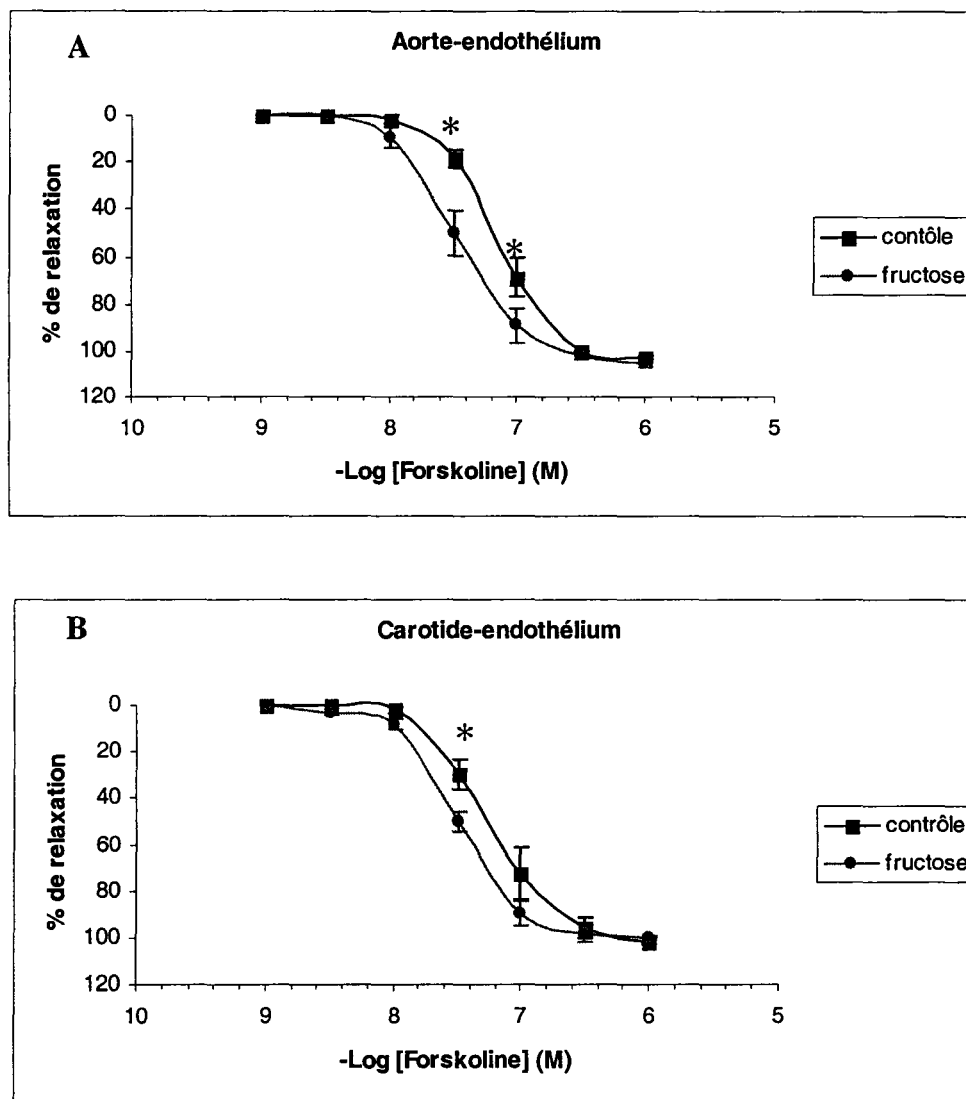
Les pEC<sub>50</sub> correspondants sont de 6.04±0.18 et 5.64±0.15 chez les rats contrôles et rats nourris au fructose respectivement, alors que les effets maximaux sont de 93.3±2.0% vs 85.3±4.3% (p<0.05).

Afin de mieux cibler le problème chez le rat nourri au fructose, nous avons utilisé des agents pharmacologiques agissant sur des éléments de la voie de signalisation impliqués dans la réponse relaxante utilisée par le récepteur β<sub>2</sub>-adrénergique. Ce récepteur est en effet couplé à une protéine G de type G<sub>s</sub>, lui permettant de stimuler l'adénylate cyclase et d'augmenter la synthèse d'AMPc, le second messager nécessaire à la propagation du signal. Pour ce faire, nous avons utilisé la forskoline, un terpène extrait de la plante indienne *Coleus forskolii* et reconnu pour activer directement l'adénylate cyclase (SEAMON *et al.*, 1983). Les CCR à la forskoline (1X10<sup>-9</sup>-1X10<sup>-6</sup> M) sur les tissus précontractés à la phényléphrine (10<sup>-8</sup> M) démontrent une différence entre les rats contrôles et ceux des rats nourris au fructose (FIGURE 13). Dans l'aorte, nous observons que la courbe des animaux nourris au fructose est déplacée vers la gauche. Ce déplacement demeure cependant non significatif. L'affinité apparente de la forskoline sur cette préparation est de 7.18±0.12 pour les contrôles et de 7.44±0.16 pour les animaux insulino-résistants (p>0.05). Nous observons cependant, aux concentrations intermédiaires (3X10<sup>-8</sup> et 10<sup>-7</sup> M) de forskoline, une différence significative entre les deux courbes. En effet, la relaxation générée par cette concentration sur l'aorte d'animaux contrôles est de 19.3±4.4% comparativement à 50.2±9.3% pour les animaux nourris au fructose (p=0.02). Les effets maximaux des deux groupes demeurent similaires (102.7±0.8% vs 105.0±1.8%; p>0.05).

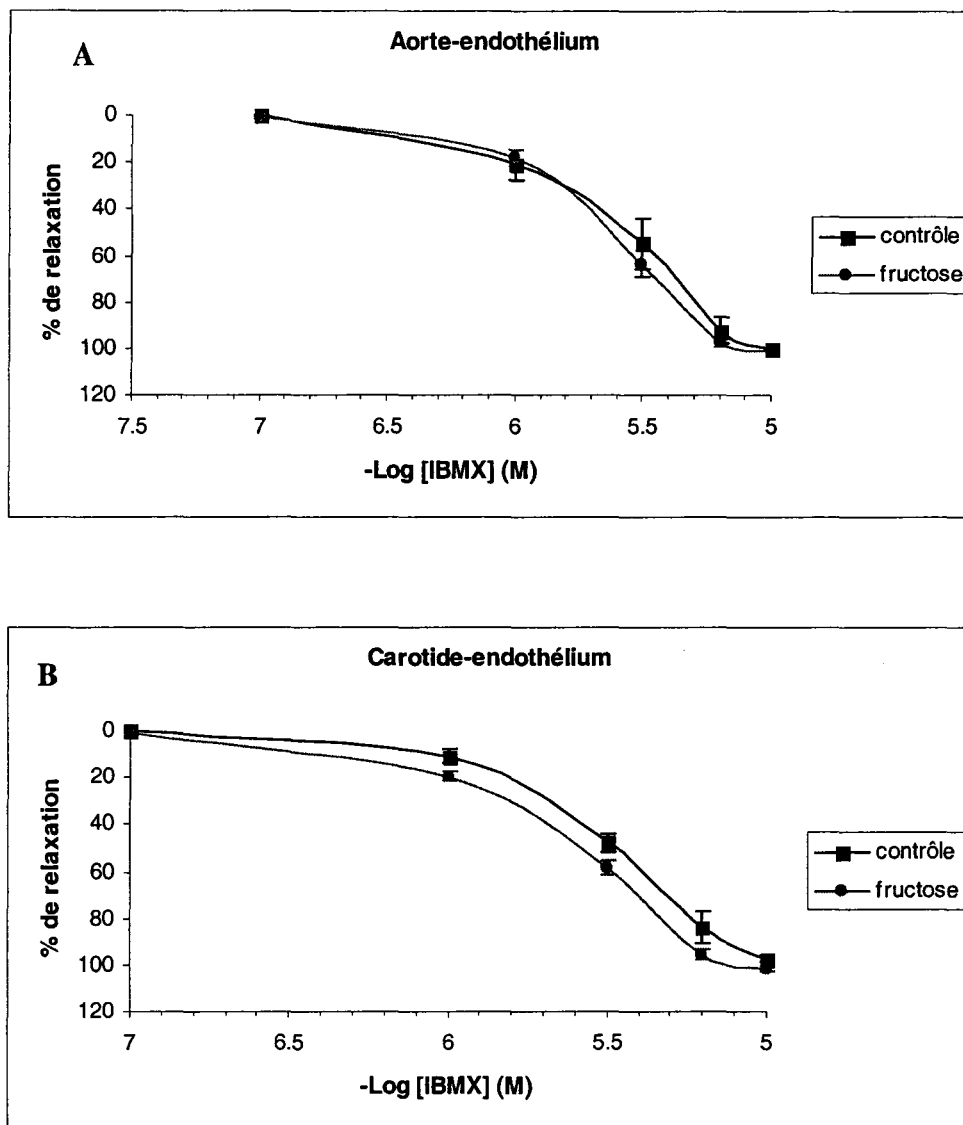
Dans la carotide, on peut également observer un déplacement de la courbe (forskoline) dans les tissus des animaux nourris au fructose mais l'écart est toutefois moins marqué et seulement la concentration 3X10<sup>-8</sup> M donne un résultat significatif. La différence d'affinité des deux courbes n'est pas significative (7.28±0.11 pour les contrôles et de 7.50±0.10 pour les rats fructosés) et les effets maximaux des deux groupes sont à toute fin pratique identiques, soit de 101.6±1.2% et de 100.4±0.9% (contrôle vs fructose) (FIGURE 13-B).

En résumé, l'utilisation de la forskoline a permis de vérifier si l'enzyme responsable de la production de l'AMPc, l'adénylate cyclase, fonctionnait adéquatement chez les rats nourris au fructose. Pour compléter l'exploration de la signalisation en aval du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique, nous pouvons également influencer les niveaux intracellulaires d'AMPc en inhibant les enzymes nécessaires à sa dégradation, i.e. les phosphodiesterases (PDE). Nous avons utilisé le 3-isobutyl-1-méthyl-xanthine (IBMX) un inhibiteur non spécifique des PDE dépendantes de l'AMPc et GMPc. Pour ce faire, nous avons donc élaboré des courbes concentration-réponses avec IBMX ( $1 \times 10^{-7}$ - $1 \times 10^{-5}$  M) sur des tissus précontractés à la phényléphrine ( $10^{-8}$  M). Dans les deux préparations, nous pouvons observer des relaxations rapides révélant la sensibilité du tissu vasculaire aux variations d'AMPc/GMPc intracellulaires (FIGURE 14). L'élévation spontanée de ces second messagers produite par l'application de l'IBMX permet d'activer les mécanismes cellulaires initiant la relaxation en aval de l'adénylate cyclase sans toutefois toucher aux éléments de la voie de signalisation en amont. Dans l'aorte, les courbes obtenues dans les deux groupes d'animaux suivent des profils similaires. Les aortes des deux groupes réagissent de façon semblable en réponse à l'IBMX. Les relaxations maximales ( $E_{\max}$ ) du groupe contrôle et du groupe fructosé sont de  $100 \pm 0.1\%$  et de  $100.7 \pm 0.7\%$  respectivement, alors que les affinités apparentes de l'inhibiteur des PDE sont de  $5.56 \pm 0.06$  et  $5.62 \pm 0.10$  (contrôle vs fructose,  $p > 0.05$ ). Pour la carotide, nous pouvons observer un très léger décalage entre les deux courbes. Cette variation entre les deux groupes demeure toutefois non significative comme en témoignent les valeurs de  $pEC_{50}$  ( $5.47 \pm 0.11$  et  $5.58 \pm 0.07$ ; contrôle vs fructose,  $p > 0.05$ ). Les relaxations maximales obtenues pour les deux groupes sont également non significatives ( $98.6 \pm 1.2\%$  et  $101.2 \pm 0.9\%$ ; contrôle vs fructose;  $p > 0.05$ ). L'activation des mécanismes cellulaires responsables de la relaxation du muscle lisse en aval de l'adénylate cyclase semble donc fonctionné normalement dans les vaisseaux des rats nourris au fructose.





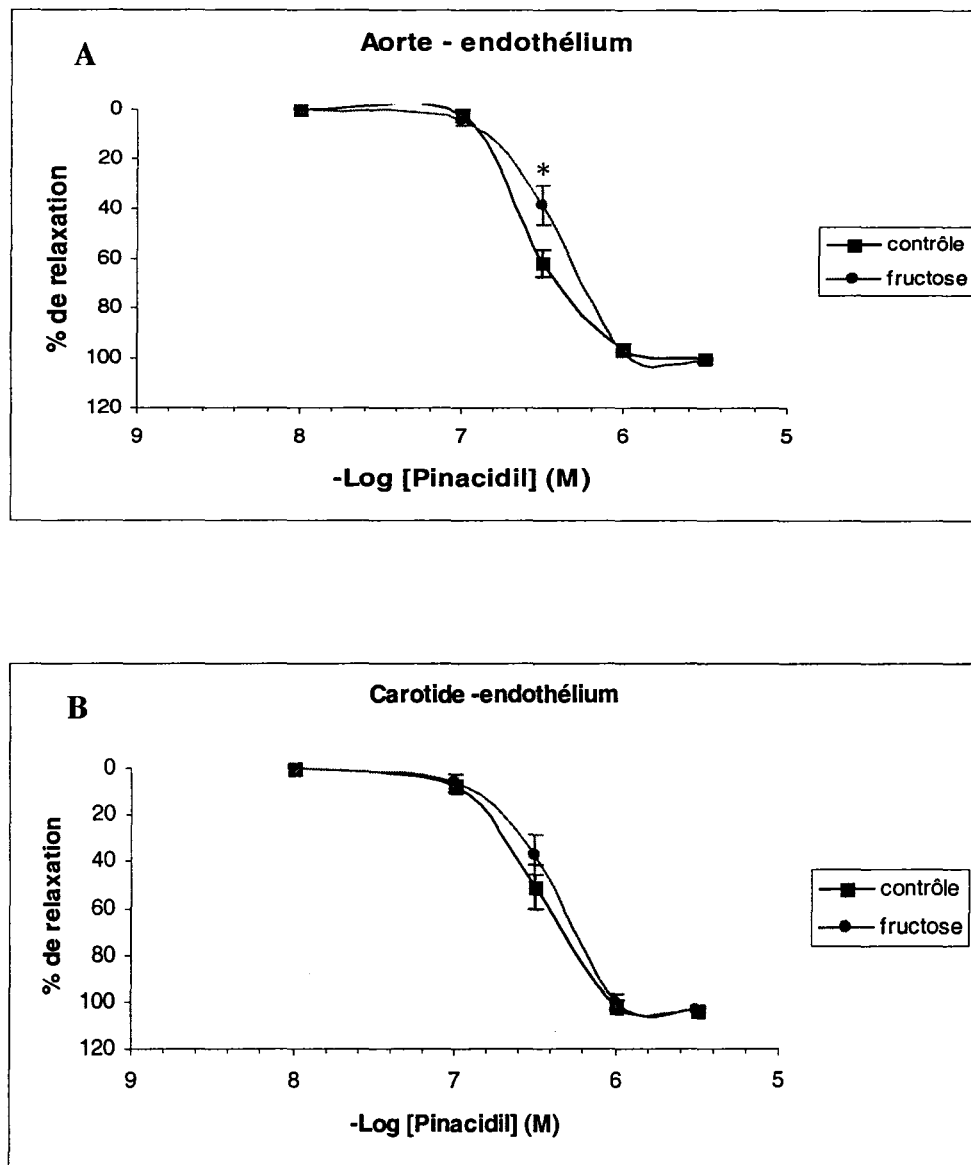
**FIGURE 13** Courbes concentration-réponses cumulatives obtenues avec la forskoline ( $1 \times 10^{-9}$ - $1 \times 10^{-6}$  M) sur l'aorte (A) et la carotide (B) de rats contrôles (■; n=7) et de rats nourris au fructose (●; n=11) dénudées de leur endothélium, préalablement contractées par la phényléphrine ( $10^{-8}$  M). Chaque point représente la moyenne et l'erreur standard. \*p<0.05



**FIGURE 14** Courbes concentration-réponses cumulatives obtenues avec l'IBMX ( $1 \times 10^{-7}$ - $1 \times 10^{-5}$  M) sur l'aorte (A) et la carotide (B) de rats contrôles (■; n=4) et de rats nourris au fructose (●; n=8) dénudées de leur endothélium et préalablement contractées par la phényléphrine ( $10^{-8}$  M). Chaque point représente la moyenne et l'erreur standard.  $p > 0.05$ .

L'ouverture des canaux potassiques est finalement l'étape culminante de la relaxation du muscle lisse. Pour terminer l'étude de la voie de signalisation du salbutamol, nous avons utilisé le pinacidil. Cette molécule permet l'ouverture des canaux potassiques sensibles à l'ATP ( $K_{ATP}$ ) et provoque une relaxation du muscle lisse (LANGE *et al.*, 2002). Les CCR au pinacidil ( $1 \times 10^{-8}$ - $3 \times 10^{-6}$  M) élaborées sur les tissus mènent à des relaxations franches sur l'aorte et la carotide (FIGURE 15). Dans l'aorte, malgré un déplacement vers la droite de la courbes des animaux nourris au fructose nous informant d'une perte d'affinité, seule la concentration  $3 \times 10^{-7}$  M donne un écart significatif ( $pEC_{50}$  :  $6.69 \pm 0.09$  vs  $6.39 \pm 0.17$ ;  $p < 0.05$ ) et suggère une perte de réactivité chez le rat nourri au fructose. Le  $E_{max}$  : demeure cependant inchangé ( $100.0 \pm 0.1\%$  vs  $101.0 \pm 0.7\%$  contrôle vs fructose respectivement,  $p > 0.05$ ).

Au niveau de la carotide, les courbes sont presque identiques et ne démontrent aucune différence significative. Les  $pEC_{50}$  sont de  $6.50 \pm 0.12$  et de  $6.38 \pm 0.09$  et les effets maximaux de  $103.5\% \pm 1.1$  et de  $100.0\% \pm 0.1$  pour le groupe contrôle et fructosé respectivement. Le fonctionnement des canaux sensibles au pinacidil semble donc être normal dans la carotide des rats résistants à l'insuline/hypertendus.



**FIGURE 15** Courbes concentration-réponses cumulatives obtenues avec pinacidil ( $1 \times 10^{-8}$ - $3 \times 10^{-6}$  M) sur l'aorte (A) et la carotide (B) de rats contrôles (■; n=6) et de rats nourris au fructose (●; n=6) dénudées de leur endothélium et contractées par la phényléphrine ( $10^{-8}$  M). Chaque point représente la moyenne et l'erreur standard. \*p<0.05.

Effet pharmacologique			Aorte		Carotide	
			Contrôle	Fructose	Contrôle	Fructose
SNP	Donneur de NO	E <sub>max</sub>	106.0±0.6%	109.0±0.2%	105.0±2.2%	107.0±0.2%
		pEC <sub>50</sub>	9.62±0.05	9.54±0.08	9.77±0.10	9.67±0.11
Adénosine	Agoniste purinergique	E <sub>max</sub>	102.0±1.0%	101.0±0.6%	104.2±1.3%	109.0±2.7%
		pEC <sub>50</sub>	4.71±0.11	4.52±0.10	4.93±0.18	4.61±0.13
Salbutamol	Agoniste β <sub>2</sub> - adrénergique	E <sub>max</sub>	101.0±2.8%	87.5±4.9%*	93.3±2.0%	85.3±4.3%*
		pEC <sub>50</sub>	6.14±0.14	5.62±0.11*	6.04±0.18	5.64±0.15*
Forskoline	Activateur de l'adénylate cyclase	E <sub>max</sub>	102.7±0.8%	105.0±1.8%	101.6±1.2%	100.4±0.9%
		pEC <sub>50</sub>	7.18±0.12	7.44±0.16	7.28±0.11	7.50±0.10
IBMX	Inhibiteur de phosphodiesterases	E <sub>max</sub>	100.0±0.1%	100.7±0.7%	98.6±1.2%	101.2±0.1%
		pEC <sub>50</sub>	5.56±0.06	5.62±0.10	5.47±0.11	5.58±0.07
Pinacidil	Ouvreur de canaux potassiques ATP- dépendant	E <sub>max</sub>	100.0±0.1%	101.0±0.7%	103.5±1.1%	100.0±0.1%
		pEC <sub>50</sub>	6.69±0.09	6.39±0.17*	6.50±1.12	6.38±0.09

**TABLEAU 3** Tableau récapitulatif des paramètres pharmacologiques des agents relaxants utilisés sur l'aorte et la carotide des rats contrôles en comparaison avec ceux nourris au fructose. Ces résultats sont obtenus sur des tissus dénudés de leur endothélium, contractés à la phényléphrine (10<sup>-8</sup> M), à l'aide de courbes dose-réponses cumulatives au sodium nitroprussiate (SNP), à l'adénosine, au salbutamol, à la forskoline, à l'IBMX et au pinacidil. \*p<0.05

### 3.4 Activité des agonistes kininergiques sur l'aorte et la carotide de rat

Les effets des agonistes kininergiques naturels (BK, KD, DBK et LDBK) ainsi que synthétiques (Phe<sup>8</sup>(CH<sub>2</sub>-NH)Arg<sup>9</sup>BK et Sar[D-Phe<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>BK), sur l'aorte et la carotide de rat normal, se résument par une absence complète de réponse à ces composés (TABLEAU 4). Malgré la présence de captopril (10<sup>-6</sup> M), aucune contraction n'a été observée, même aux fortes concentrations (10 µM) des différents analogues utilisés. L'absence d'effet est observé aussi pour la relaxation endothélium-dépendante des tissus précontractés à la phényléphrine (10<sup>-7</sup> M) sur lesquels l'ACh (1X10<sup>-9</sup> M à 1X10<sup>-6</sup> M) menait à des relaxations complètes. L'utilisation d'une concentration de phényléphrine (3X10<sup>-8</sup> M) plus faible a permis de montrer l'absence d'effets relaxants des analogues kininergiques. L'absence de réactivité aux kinines pour l'aorte et la carotide chez les animaux nourris au fructose est identique à celle des animaux contrôles (résultats non-montrés). Les kinines (BK et DBK) sont cependant actives sur la veine porte hépatique de rats normaux (résultats non-montré; REGOLI et BARABÉ, 1980).

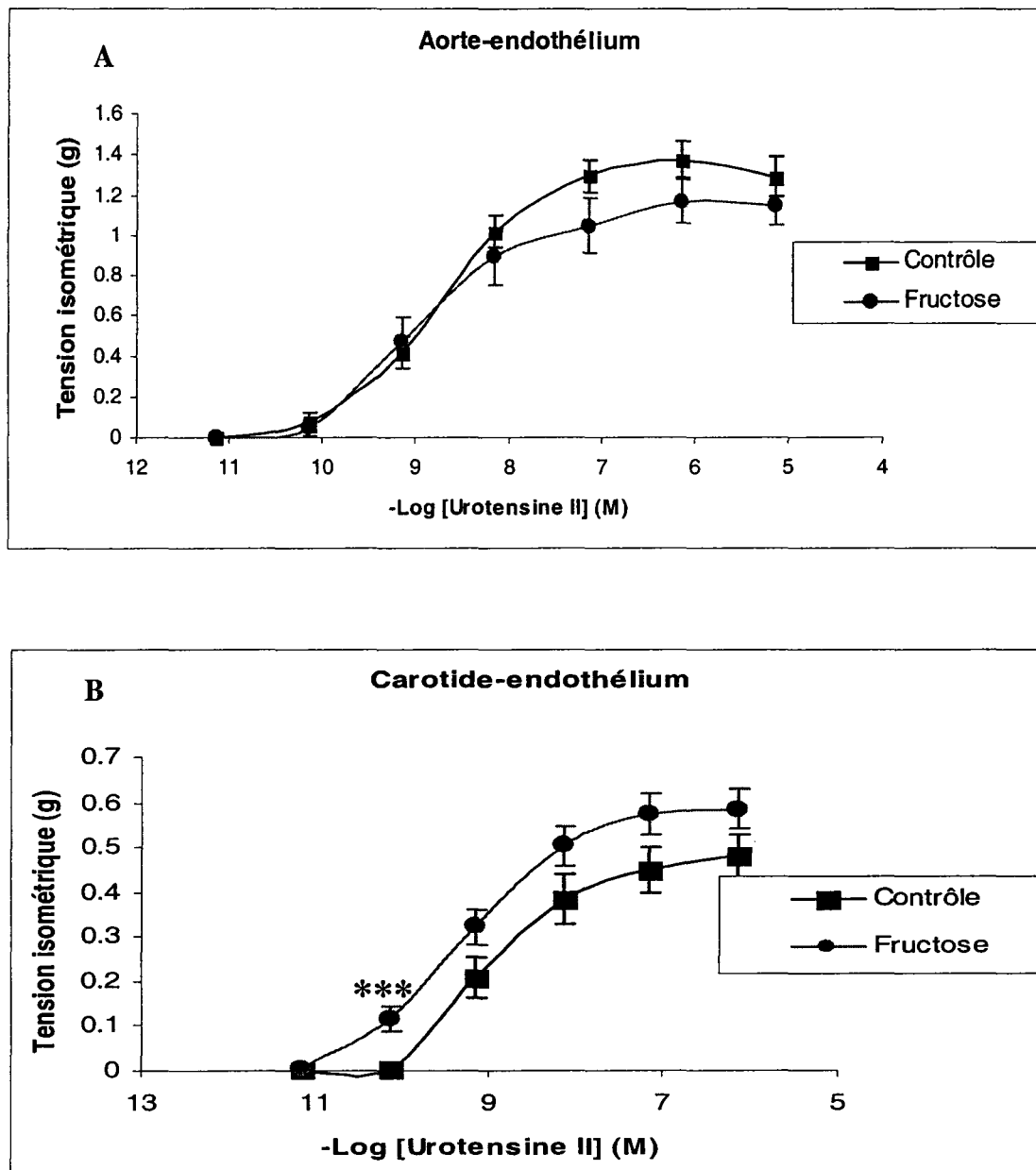
	Aorte		Carotide	
	Contraction	Relaxation	Contraction	Relaxation
<b>Bradykinine (Bk)</b>	inactif	inactif	inactif	inactif
<b>Kallidine</b>	inactif	inactif	inactif	inactif
<b>Phe<sup>8</sup>(CH<sub>2</sub>-NH)Arg<sup>9</sup>Bk</b>	inactif	inactif	inactif	inactif
<b>DesArg<sup>9</sup>bradykinine</b>	inactif	inactif	inactif	inactif
<b>LysdesArg<sup>9</sup>bradykinine</b>	inactif	inactif	inactif	inactif
<b>Sar[D-Phe<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>Bk</b>	inactif	inactif	inactif	inactif

**TABLEAU 4.** Tableau récapitulatif de l'effet des kinines et des analogues sur l'aorte et la carotide de rat normaux. L'application des différents agonistes (10<sup>-9</sup> M à 10<sup>-5</sup> M) se fait sur la tension de base pour vérifier l'effet contractile sur des tissus dépourvus d'endothélium alors que pour l'effet relaxant, l'application des différents composés se fait sur des tissus précontractés à la phényléphrine (5X10<sup>-8</sup> M) en présence de captopril (10<sup>-6</sup> M) et où l'endothélium est demeuré intact. n=4 animaux par groupe.

### 3.5 Effets contractiles des agents peptidiques et non-peptidiques

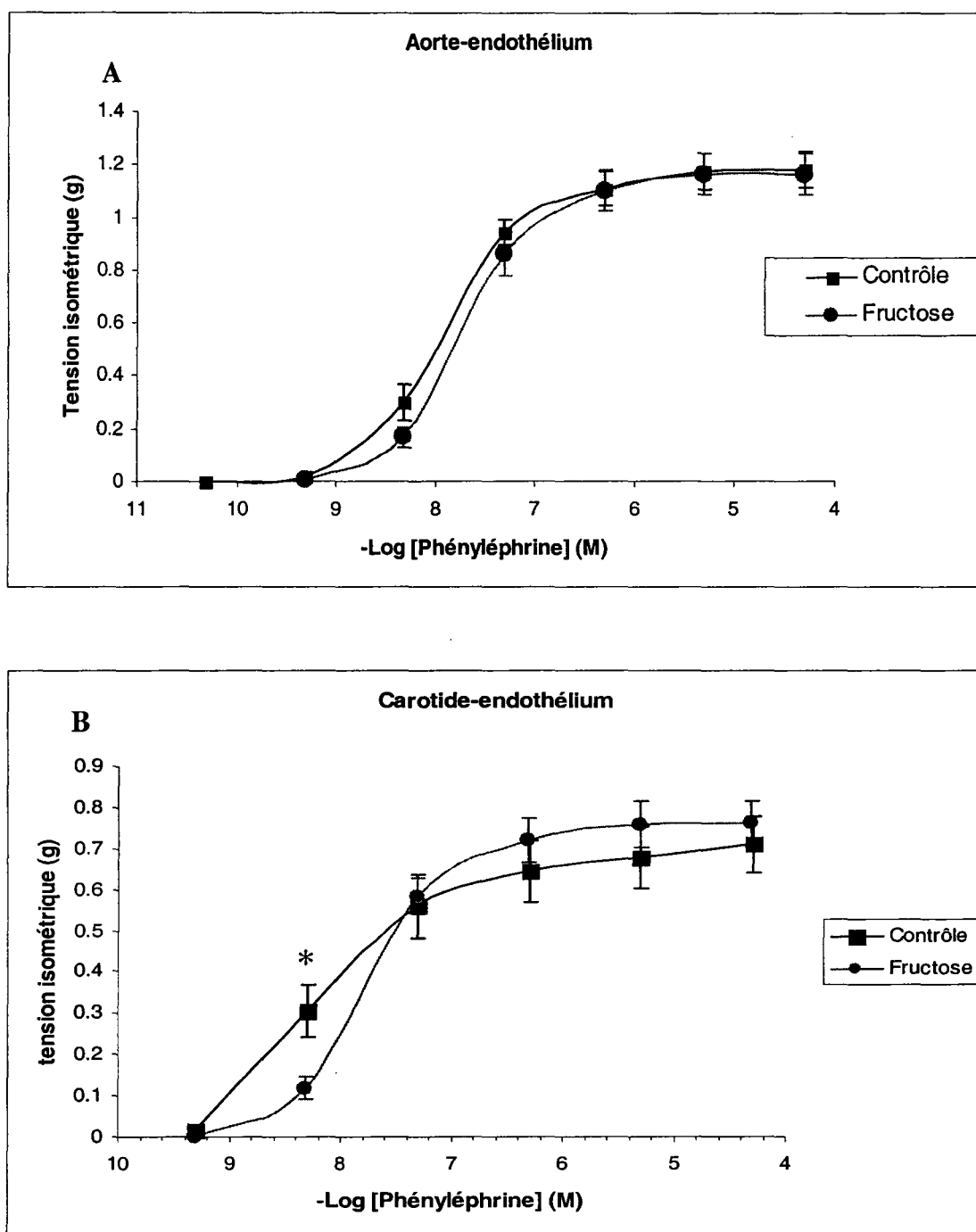
Les courbes concentration-réponse cumulatives à l'urotensine II (Uro II,  $7.2 \times 10^{-12}$ - $7.2 \times 10^{-6}$  M) faites sur l'aorte ne démontrent pas de différences significatives entre les animaux du groupe contrôle et ceux nourris au fructose ( $E_{\max}$  :  $1.38 \pm 0.09$  g vs  $1.17 \pm 0.11$  g,  $pEC_{50}$  :  $8.81 \pm 0.19$  vs  $8.97 \pm 0.27$  respectivement) (FIGURE 16). Cependant, la carotide montre de légères différences aux faibles concentrations d'Uro II. Dans cette préparation, la concentration seuil est plus basse chez les rats nourris au fructose que chez les rats contrôles ( $7.2 \times 10^{-10}$  vs  $7.2 \times 10^{-9}$  M;  $p < 0.001$ ). Nous n'observons cependant pas de différence significative ni au niveau de l'effet maximal, ni au niveau de l'affinité bien qu'il y ait un profil légèrement différent entre les deux courbes ( $E_{\max}$  :  $0.59 \pm 0.04$  g vs  $0.48 \pm 0.05$  g,  $pEC_{50}$   $8.83 \pm 0.20$  vs  $9.17 \pm 0.11$ , contrôle vs fructose respectivement). Cette observation suggère une sensibilité accrue aux faibles doses d'Uro II dans la carotide des animaux insulino-résistants. Cette observation n'est pas concordante avec les résultats obtenus sur l'aorte et suggère peut-être des particularités intrinsèques à ce tissu.

Les CCR générées avec la phényléphrine ( $4.9 \times 10^{-10}$ - $4.9 \times 10^{-5}$  M) sur l'aorte et la carotide mènent à des courbes presque identiques entre les rats normaux et les rats nourris au fructose, et ce sur les deux préparations (FIGURE 17). Pour l'aorte, l'effet maximal est de  $1.18 \pm 0.11$  g vs  $1.16 \pm 0.08$  g, et l'affinité apparente ( $pEC_{50}$ ) de  $7.76 \pm 0.08$  vs  $7.63 \pm 0.05$  pour le groupe contrôle et le groupe nourri au fructose respectivement. La carotide démontre également un effet maximal de même amplitude dans les deux groupes, soit de  $0.68 \pm 0.08$  g pour les rats contrôles et de  $0.76 \pm 0.06$  g pour les rats nourris au fructose. Nous pouvons cependant observer dans la carotide une différence au niveau de l'affinité de l'agoniste adrénergique. En effet, les animaux du groupe contrôle possèdent un  $pEC_{50}$  plus grand que celui des animaux nourris au fructose ( $7.92 \pm 0.09$  vs  $7.57 \pm 0.03$ ;  $p < 0.001$ ). Cette différence est observée aux faibles doses de phényléphrine alors que les fortes doses présentent le même profil. La carotide montre encore une fois des changements chez les rats insulino-résistants. Cette fois-ci, nous observons une perte d'affinité de la



**FIGURE 16** Courbes concentration-réponses cumulatives obtenues avec l'Urotensine II ( $7.2 \times 10^{-12}$ - $7.2 \times 10^{-6}$  M) sur l'aorte (A) et la carotide (B) de rats contrôles (■; n=6) et de rats nourris au fructose (●; n=10) dénudées de leur endothélium. Chaque point représente la moyenne et l'erreur standard. \*\*\*p<0.001.





**FIGURE 17** Courbes concentration-réponses cumulatives obtenues avec phényléphrine ( $4.9 \times 10^{-10}$ – $4.9 \times 10^{-5}$  M) sur l'aorte (A) et la carotide (B) de rats contrôles (■; n=10) et de rats nourris au fructose (●; n=11) dénudées de leur endothélium. Chaque point représente la moyenne et l'erreur standard. \*p<0.05.

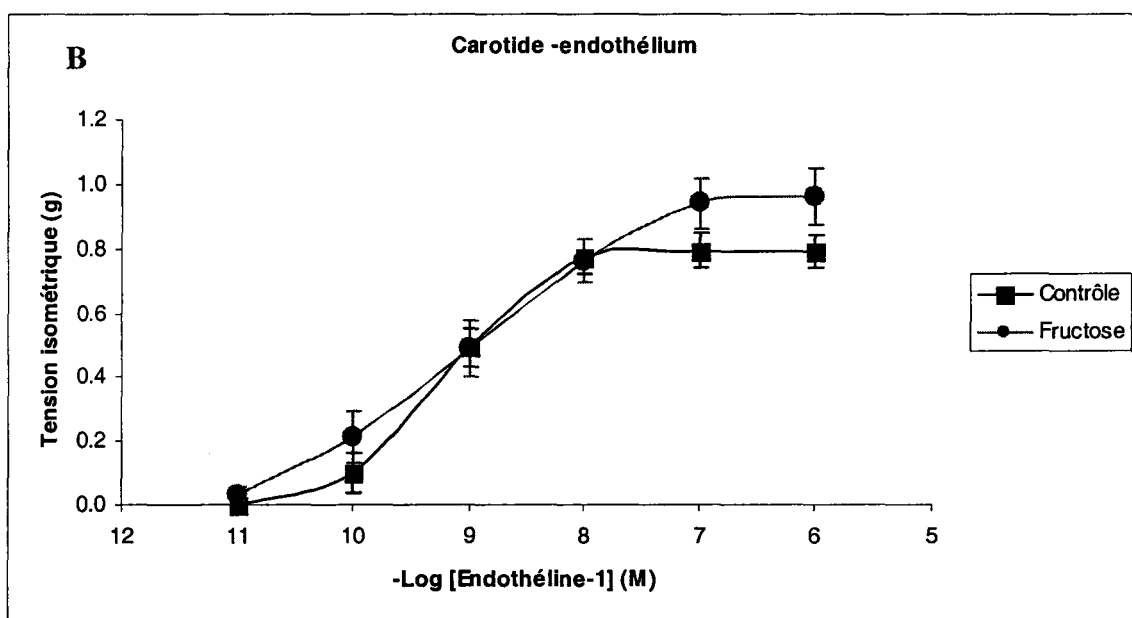
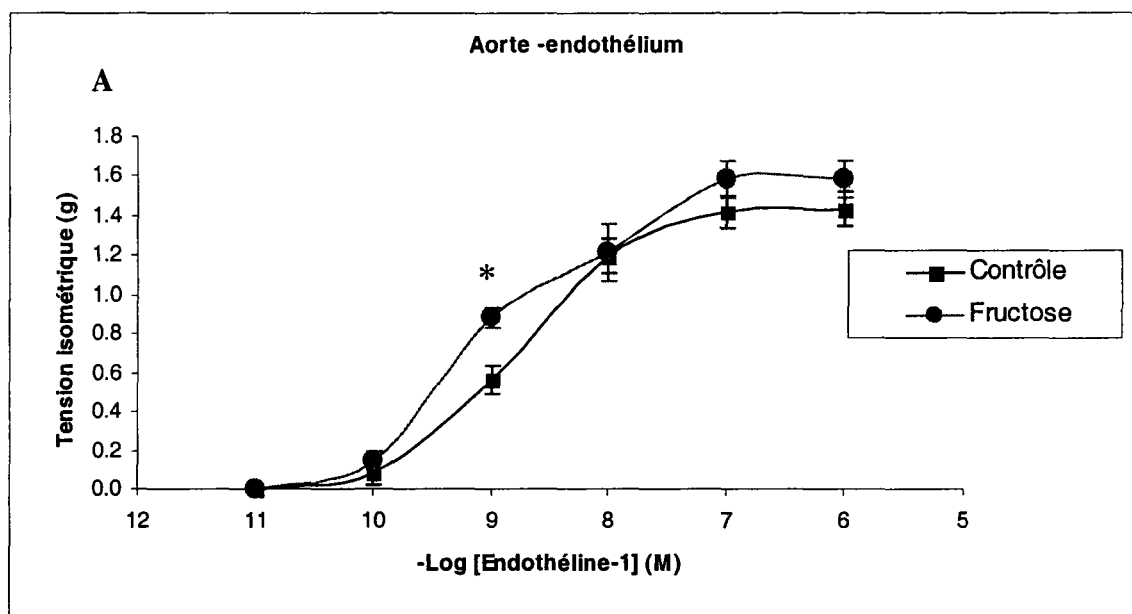
phényléprine pouvant être possiblement expliquée par une perte de sensibilité des récepteurs alpha-adrénergiques.

L'utilisation de l'endothéline-1 (ET-1) est très importante pour notre étude. L'ET-1 est un puissant vasoconstricteur (MAGUIRE et DAVENPORT, 2002). De plus, la littérature rapporte que la densité des récepteurs ET<sub>A</sub> pourrait être augmentée dans l'aorte des rats nourris au fructose (JUAN *et al.*, 1998). L'ET-1 pourrait donc avoir un rôle important dans la physiopathologie de la résistance à l'insuline et contribuer au développement de l'hypertension artérielle.

Les courbes CCR ( $1 \times 10^{-11}$ - $1 \times 10^{-6}$  M) générées par l'ET-1 sur l'aorte suivent un profil semblable dans les deux groupes (FIGURE 18). La contraction obtenue à l'aide de la concentration  $1 \times 10^{-9}$  M donne une contraction plus élevée chez les rats nourris au fructose ( $0.57 \pm 0.08$  g vs  $0.88 \pm 0.05$  g ;  $p < 0.05$ , contrôle vs fructose) mais aucune autre donnée présente des différences significatives. Malgré un déplacement vers la gauche de la courbe pour les rats nourris au fructose, les différences d'affinité et d'effet maximal observées demeurent non significatives ( $pEC_{50}$  :  $8.83 \pm 0.14$  vs  $9.34 \pm 0.18$ ,  $E_{max}$  :  $1.43 \pm 0.08$  g vs  $1.58 \pm 0.09$  g,  $p > 0.05$ , contrôle vs fructose respectivement).

Dans la carotide, les CCR présentent une affinité semblable entre les groupes. Le  $pEC_{50}$  de ET-1 sur cette préparation est de  $9.62 \pm 0.24$  pour les rats contrôles et de  $9.59 \pm 0.22$  pour les rats nourris au fructose ( $p > 0.05$ ). L'effet maximal de la courbe des rats fructosés est légèrement plus élevé chez les rats nourris au fructose ( $0.78 \pm 0.08$  g vs  $0.98 \pm 0.09$  g ;  $p = 0.09$ , contrôle vs fructose). Un nombre plus élevé de récepteurs sur la carotide des rats insulino-résistants/hypertendus pourrait expliquer cette augmentation qui n'est cependant pas significative. Ceci est en accord avec l'étude de Juan et collaborateurs (1998).

L'étude comparant les effets contractiles sur les vaisseaux des rats contrôles et fructosés ne serait pas complète sans l'utilisation de l'angiotensine II (Ang II). Le rôle potentiel de cet octapeptide dans la résistance à l'insuline demeure toujours obscur, mais les effets bénéfiques sur la sensibilité à l'insuline des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de



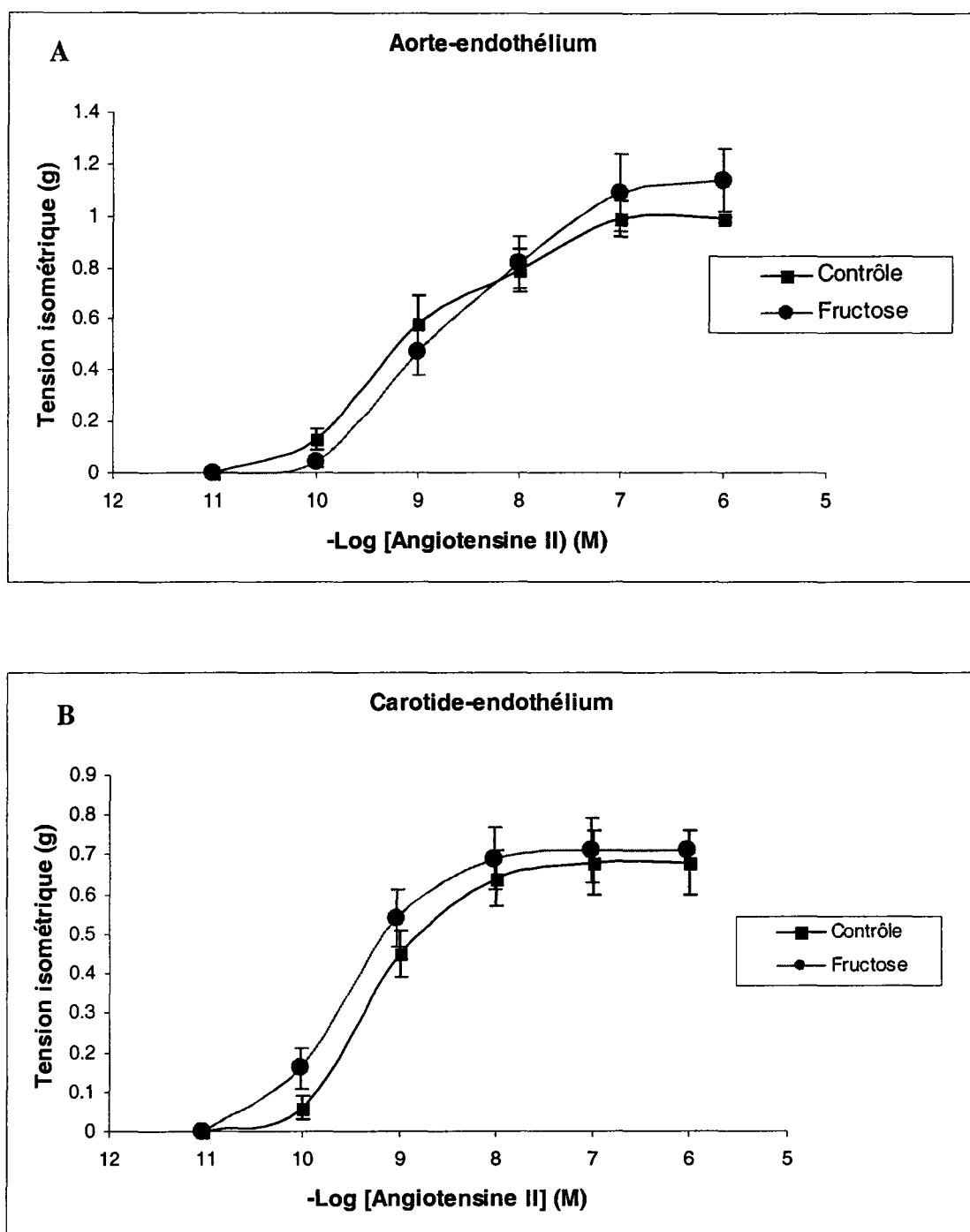
**FIGURE 18** Courbes concentration-réponses cumulatives obtenues avec l'endothéline-1 ( $1 \times 10^{-11}$ - $1 \times 10^{-6}$  M) sur l'aorte (A) et la carotide (B) de rats contrôles (■; n=7) et de rats nourris au fructose (●; n=7) dénudées de leur endothélium. Chaque point représente la moyenne et l'erreur standard. \*p<0.05.

l'angiotensine ainsi que des antagonistes du récepteur AT<sub>1</sub> suggèrent un rôle dans cette pathologie (ERLICH et ROSENTHAL, 1995, IIMURA *et al.*, 1995).

Les CCR ( $9.5 \times 10^{-12}$ - $9.5 \times 10^{-7}$  M) générées avec l'Ang II sur les deux préparations utilisées ne permettent pas d'observer de différences entre les deux groupes (FIGURE 18). L'allure des courbes est très similaire et dans l'aorte, les valeurs des E<sub>max</sub> sont de  $0.99 \pm 0.07$  g et de  $1.14 \pm 0.12$  g pour les rats contrôles et les rats nourris au fructose respectivement, alors que, dans le même ordre, les pEC<sub>50</sub> sont de  $8.85 \pm 0.12$  et de  $8.61 \pm 0.16$ . Dans la carotide, les E<sub>max</sub> sont de  $0.68 \pm 0.08$  g pour les animaux contrôles et de  $0.71 \pm 0.08$  g pour les animaux nourris au fructose. Dans cette préparation, l'affinité demeure également très proche entre les deux groupes étudiés (pEC<sub>50</sub> :  $9.15 \pm 0.11$  vs  $9.32 \pm 0.12$ , contrôle vs fructose). L'utilisation de vaisseaux isolés n'a donc pas permis de mettre en évidence de différences importantes dans la réactivité à l'Ang II de ces deux préparations tissulaires. Les changements de densité de récepteurs rapportés par Iyer et collaborateurs (1996) chez le rat nourri au fructose ont été montrés au niveau du muscle cardiaque (ventricule gauche) et nos expériences ne supportent pas que des phénomènes semblables soient observés dans les artères de conductance comme l'aorte ou la carotide.

Si nous comparons les résultats de l'effet contractile des différents agonistes entre l'aorte et la carotide de rat normaux (FIGURE 20, Tableau 6), nous observons que l'ordre d'affinité des agonistes utilisés montre des différences importantes (AngII=ET-1=UroII>Phe vs ET-1>AngII≥UroII>Phe; aorte et carotide respectivement). En effet, l'Ang II, l'ET-1 et l'Uro II sont équipotents au niveau de l'aorte alors que ET-1 est beaucoup plus efficace au niveau de la carotide comparativement à l'Ang II et l'Uro II chez le rat normal. Cette différence est encore plus facile à observer lorsque nous comparons l'ordre des E<sub>max</sub> entre les deux tissus (ET-1>UroII>Phe≥AngII vs ET-1>AngII=Phe≥Uro; aorte et carotide respectivement). L'Uro II, qui est second dans l'aorte, se retrouve bon dernier au niveau de la carotide démontrant que l'undécapeptide n'est pas aussi efficace à stimuler la carotide comparativement à l'aorte. Ceci est en accord avec beaucoup de données de la littérature (AMES *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 1999;

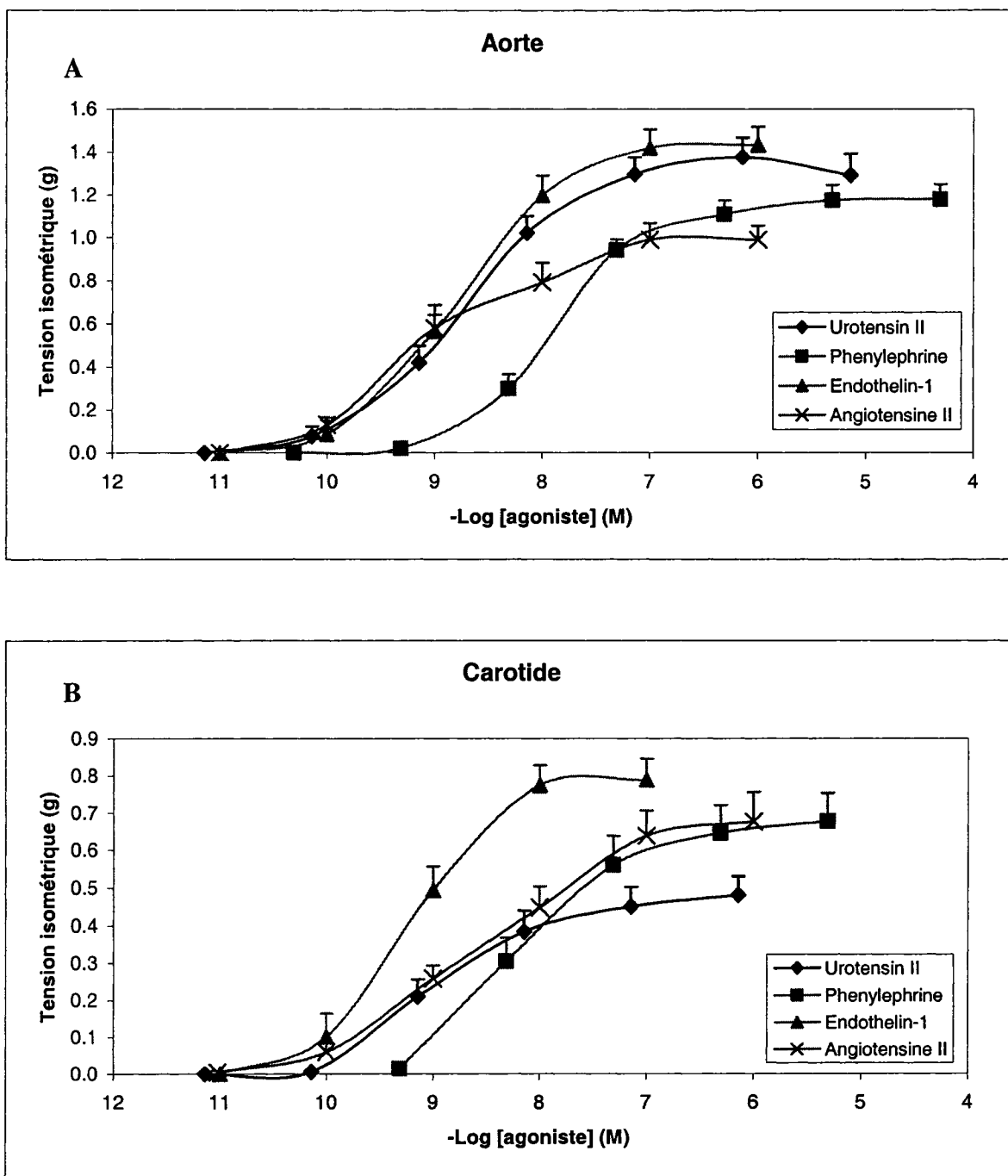
MORI *et al.*, 1999; NOTHACKER *et al.*, 1999; DAVENPORT et MAGUIRE, 2000). La même comparaison faite entre les animaux contrôles et ceux nourris au fructose montre dans l'aorte un changement dans l'ordre des affinités. En effet, chez les animaux contrôles, l'Ang II, l'ET-1 et l'Uro II sont équipotents alors que chez les animaux nourris au fructose, ET-1 démontre une plus grande affinité que les autres agonistes (AngII=ET-1=UroII>Phe vs ET-1>AngII≥UroII>Phe; contrôle vs fructose). Au niveau de  $E_{max}$ , l'ordre est inchangé. Nous n'observons pas de changements dans l'ordre d'affinité et d'efficacité au niveau de la carotide.



**FIGURE 19** Courbes concentration-réponses cumulatives obtenues avec l'angiotensine II ( $9.5 \times 10^{-12}$ - $9.5 \times 10^{-5}$  M) sur l'aorte (A) et la carotide (B) de rats contrôles (■; n=6) et de rats nourris au fructose (●; n=10) dénudées de leur endothélium. Chaque point représente la moyenne et l'erreur standard.

		Aorte		Carotide	
		Contrôle	Fructose	Contrôle	Fructose
Uro II	E <sub>max</sub>	1.38±0.09	1.17±0.11	0.59±0.04	0.48±0.05
	pEC <sub>50</sub>	8.81±0.19	8.97±0.27	8.83±0.20	9.17±0.11
Phe	E <sub>max</sub>	1.18±0.11	1.16±0.08	0.68±0.08	0.76±0.06
	pEC <sub>50</sub>	7.76±0.08	7.63±0.05	7.92±0.09	7.57±0.03*
ET-1	E <sub>max</sub>	1.43±0.08	1.58±0.09	0.78±0.08	0.98±0.09
	pEC <sub>50</sub>	8.83±0.14	9.34±0.18	9.62±0.24	9.56±0.22
AngII	E <sub>max</sub>	0.99±0.07	1.14±0.12	0.68±0.08	0.71±0.08
	pEC <sub>50</sub>	8.85±0.12	8.61±0.16	9.15±0.11	9.32±0.12

**TABLEAU 5** Tableau récapitulatif des paramètres pharmacologiques des agents contractiles utilisés sur l'aorte et la carotide (sans endothélium) de rat contrôles et nourris au fructose. Ces résultats sont obtenus à l'aide de courbes dose-réponses cumulatives d'urotensine II (UroII), de phényléphrine (Phe), d'endothéline-1 (ET-1) et d'angiotensine II (AngII). \*P=0.001



**FIGURE 20** Courbes concentration-réponses cumulatives obtenues avec l'UroII (◆; n=6), la phényléphrine (■; n=10), l'ET-1 (▲; n=7) et l'Ang II (×; n=6) sur l'aorte (A) et la carotide (B) de rats normaux dénudés de leur endothélium. Chaque point représente la moyenne et l'erreur standard.



		Aorte	Carotide
pEC <sub>50</sub>	Contrôle	AngII=ET-1=UroII>Phe	ET-1≥AngII≥UroII>Phe
	Fructose	ET-1>AngII≥UroII>Phe	ET-1≥AngII≥UroII>Phe
E <sub>max</sub>	Contrôle	ET-1>UroII>Phe≥AngII	ET-1>Phe=AngII>UroII
	Fructose	ET-1>UroII=AngII=Phe	ET-1>Phe=AngII>UroII

**TABLEAU 6** Tableau comparatif de l'ordres d'affinité et d'effet maximal des différents agonistes contractiles sur l'aorte et la carotide de rats contrôles et nourris au fructose.

## Discussion

### 4.1 Physiologie

#### 4.1.1 Modèle animal

Nous avons démontré dans cette présente étude qu'une diète riche en fructose mène, chez le rat Sprague-Dawley, à des changements métaboliques qui sont compatibles avec le syndrome de résistance à l'insuline (Tableau 2). Bien que les mécanismes par lesquels la diète riche en fructose mène à la résistance à l'insuline ne soient pas bien connus, plusieurs groupes dont le nôtre ont travaillé avec ce modèle (GUTMAN *et al.*, 1987; HWANG *et al.*, 1987). Les changements observés dans notre étude sur les rats nourris au fructose, à savoir une pression artérielle, une triglycémie et une insulémie augmentées sont en accord avec les données d'études précédentes (HWANG *et al.*, 1987; IYER et KATOVICH, 1996; CHAKIR *et al.*, 1998; JUAN *et al.*, 1998; SHINOZAKI *et al.*, 1999; KATAKAM *et al.*, 1999; TOGASHI *et al.*, 2002). L'ensemble des changements observés dans ce modèle expérimental est intéressant de par ses similitudes avec le syndrome métabolique bien décrit chez l'humain (ZAVARONI *et al.*, 1982; HWANG *et al.*, 1987). Bien que nous n'ayons pas mesuré la sensibilité à l'insuline chez les animaux de notre étude (clamp euglycémique), nous avons toutes les raisons de croire que les rats soumis à la diète riche en fructose étaient bel et bien résistants à l'insuline. Comme le témoigne les changements présentés au tableau 2, le gain pondéral observé chez les deux groupes d'animaux (contrôles et nourris au fructose) durant les quatre semaines était similaire. Ceci confirme que l'obésité n'est pas un facteur à considérer dans les changements induits par une diète riche en fructose. Les valeurs des glycémies observées dans notre étude sont relativement plus élevées que les valeurs observées dans la majorité des études citées plus haut et, tel qu'indiqué précédemment, elles sont probablement attribuables au fait que nous avons mesuré la glycémie en période

postprandiale (non à jeun). Le fait que la glycémie postprandiale chez les animaux nourris au fructose soit significativement plus élevée que chez les rats contrôles est suggestif d'une intolérance au glucose (SANTURÉ *et al.*, 2002).

#### **4.1.2 Hypertension**

Dans notre étude, la pression artérielle mesurée chez le rat nourri au fructose, un modèle non-obèse de résistance à l'insuline, était significativement plus importante (Tableau 2). Il est connu depuis longtemps qu'il existe un lien entre l'obésité, la résistance à l'insuline et l'hypertension (MODAN *et al.*, 1985, LUCAS *et al.*, 1985). L'hypertension essentielle chez les individus non-obèses a aussi été reliée à la résistance à l'insuline et à l'hyperinsulinémie (FERRANNINI *et al.*, 1987, BONORA *et al.*, 1987). Le mécanisme reliant l'hypertension à la résistance à l'insuline pourrait impliquer plusieurs mécanismes tels a) la dysfonction vasculaire endothéliale (STEINBERG *et al.*, 1996), b) l'augmentation de la réabsorption du sodium par le rein secondaire à l'hyperinsulinémie (DEFRONZO, 1981) et c) l'augmentation de l'activité du système nerveux sympathique (ROWE *et al.*, 1981). Il semble que la réabsorption du sodium ne soit pas toutefois reliée à l'effet presseur chez le rat nourri au fructose (IYER et KATOVICH, 1996). Dans cette étude, nous avons poussé plus loin l'étude de la réactivité vasculaire afin de mieux comprendre les mécanismes qui pourraient être responsables de l'hypertension dans le modèle du rat nourri au fructose.

#### **4.1.3 Réactivité vasculaire endothélium-dépendante**

L'étude de la réactivité vasculaire dans notre étude démontre une perte de relaxation endothélium dépendante à l'ACh dans l'aorte et la carotide des rats insulino-résistants/hypertendus et suggère une dysfonction endothéliale. En effet, la cellule endothéliale semble incapable de générer les vasorelaxants de façon suffisante pour initier une relaxation de même amplitude que chez les rats contrôles. Ceci est appuyé par le fait que la relaxation du muscle lisse vasculaire à l'EDRF/NO n'est pas

diminuée chez les rats nourris au fructose, car les relaxations initiées par le SNP demeurent identiques dans les tissus vasculaires des deux groupes d'animaux. Ceci est aussi en accord avec des études chez le rat nourri au fructose rapportant des pertes de relaxation endothélium-dépendante dans divers lits vasculaires tels l'artère mésentérique (RICHEY *et al.*, 1998), l'aorte thoracique (SHINOZAKI *et al.*, 1999) et l'artère cérébrale (ERDOS *et al.*, 2002). En présence de L-NNA et d'indométhacine (FIGURE 8), la libération de NO et PGI<sub>2</sub> est supprimée et la relaxation résiduelle est attribuable à un facteur endothélial connu sous le nom EDHF. Dans le contexte de résistance à l'insuline (Figure 9), il semble que l'EDHF ne soit pas impliqué comme nous n'avons pas observé de relaxation résiduelle différente entre les deux groupes d'animaux. Nous parlerons de la relaxation endothélium dépendante observée en présence d'inhibiteur (L-NNA et indométhacine) plus loin dans la discussion. Le système du monoxyde d'azote semble donc être central pour expliquer la dysfonction endothéliale chez le rat nourri au fructose. Quelques évidences retrouvées dans la littérature pointent en direction de la eNOS. Shinozaki et collaborateurs rapportent une diminution de l'activité de eNOS dans l'aorte du rat nourri au fructose. De plus, cette même équipe observe une augmentation de la relâche d'ion O<sub>2</sub><sup>-</sup> par les cellules endothéliales dans ces mêmes conditions (SHINOZAKI *et al.*, 1999). Selon ces auteurs, la perte de relaxation endothéliale dépendante pourrait s'expliquer par une diminution de production de NO causée par une perte d'activité de la eNOS, mais aussi par une dégradation plus rapide du NO par le O<sub>2</sub><sup>-</sup> produit abondamment dans la vasculature des animaux insulino-résistants. Puisque nous utilisons le même modèle que Shinozaki et collaborateurs, ces phénomènes pourraient très bien expliquer la perte de relaxation-endothélium dépendante observée dans la carotide et l'aorte des rats résistants à l'insuline. Ces mêmes auteurs rapportent également un appauvrissement en tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>), un cofacteur important pour l'activation de eNOS, dans les cellules endothéliales des rats résistants à l'insuline. L'administration de BH<sub>4</sub> rétablit la production de NO à des niveaux proches à ceux des animaux contrôles (SHINOZAKI *et al.*, 1999). Ceci a également un effet bénéfique en diminuant la concentration de O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Ces observations sont donc tout à fait compatibles avec les études démontrant qu'un supplément en cofacteurs ou en substrats de eNOS, dans la diète, rétablit l'activité de l'enzyme (PIEPER, 1997; PIEPER, 1998; TAY *et al.*, 2002). Ceci suggère aussi qu'il

existe, chez les rats insulino-résistants/hypertendus, un lien entre l'excès de stress oxydatif vasculaire et la dysfonction endothéliale. Ces phénomènes ont été aussi décrits dans le diabète type 2 (TING *et al.*, 1996) et l'hypertension (KONTOS et KONTOS, 1995).

Il semble également que l'activité de la eNOS soit sensible à l'hyperglycémie (DU *et al.*, 2001). Dans de telles conditions, le résidu sérine-1177 serait modifié (N-acétylglucosaminé) et diminuerait de façon significative les fonctions de l'enzyme. Nous avons observé chez nos rats nourris au fructose une glycémie significativement plus élevée; il est donc possible que ceci entraîne la perte de relaxation endothéliale dépendante comme dans la carotide et l'aorte. Nos résultats démontrent un déplacement vers la droite des courbes de relaxation associé avec une perte d'effet maximal dans les deux préparations utilisées (FIGURE 5). Les deux mécanismes ci-haut mentionnés expliquent donc bien la perte d'affinité apparente, mais expliquent moins bien la perte de relaxation maximale. La perte de relaxation maximale résulte en général d'une réduction de la densité des récepteurs ou des éléments en aval du récepteur. L'affinité apparente de nos essais sur l'effet endothéliale dépendant de l'ACh nous renseigne pharmacologiquement sur la densité des récepteurs muscariniques. La relaxation de l'ACh en condition d'inhibition par L-NNA et indométhacine, comme nous l'avons mentionné plus haut, ne démontre aucune perte au niveau de l'effet maximal ( $E_{max}$ ) et suggère donc qu'il n'y a pas perte de récepteurs muscariniques.

Nous rapportons pour la première fois que la carotide est elle aussi associée à une dysfonction endothéliale. Cette observation ainsi que celles d'autres chercheurs suggère que cette anomalie vasculaire est présente à plusieurs endroits dans le système vasculaire. Il semble que la résistance à l'insuline joue un rôle majeur dans la dysfonction endothéliale puisque cette anomalie est retrouvée dans plusieurs modèles animaux de résistance à l'insuline, comme la souris invalidée génétiquement pour l'"insulin receptor substrate-1" (IRS-1; ABE *et al.*, 1998), chez le rat Otsuka-Long-Evans Tokushima Fatty (OLEF; SAKAMOTO *et al.*, 1998) et le rat corpulent de type JCR :LA (O'BRIEN, 1999). La présence de résistance à l'insuline semble être essentielle dans ces différents modèles car l'hyperinsulinémie obtenue par une administration exogène d'insuline

n'augmente pas la pression artérielle chez le rat Sprague-Dawley (SHINOZAKI *et al.*, 1999). Elle n'a pas non plus d'effet presseur additionnel chez le Wistar ou chez le rat spontanément hypertendu (SHR) chez qui une transplantation d'un second pancréas mène à une hyperinsulinémie importante (ABE *et al.*, 1996).

Les anomalies décrites dans différentes études dont la nôtre révèlent des changements physiologiques générés par la diète au fructose. On rapporte que le simple fait d'incuber des artères dans des bains d'organes isolés en présence de fortes concentrations de sucre provoque une perte de relaxation endothélium dépendante (DORIGO *et al.*, 1997; GUO *et al.*, 2000). Le mannitol, un polyol non-métabolisé, ne cause pas d'anomalies même à fortes concentrations suggérant un mécanisme dépendant du métabolisme.

Certains hydrates de carbone sont reconnus pour se fixer de façon non-enzymatique au groupement amine libre des protéines et des lipides. Les produits de la glycosylation avancée (AGE) sont formés de façon quasi-irréversible en passant par une série de réactions d'oxydations et de non-oxydatives. Ces produits s'accumulent avec le temps dans les tissus, altèrent l'élasticité de ces derniers, et peuvent contribuer au développement de complications, notamment dans le diabète (BROWLEE, 1991; DE VRIESE *et al.*, 2000), l'athérosclérose et l'hypertension (CERAMI *et al.*, 1986). La diète au fructose est reconnue pour augmenter la glycosylation tissulaire (LEVI et WERMAN, 1998). De plus, le fructose semble être plus efficace à glycosyler le collagène que le glucose (OIMOMI *et al.*, 1989). Il est donc possible, chez le rat nourri au fructose, que la glycosylation tissulaire puisse jouer un rôle dans le développement des complications cardiovasculaires comme l'hypertension.

#### 4.1.4 Étude de la relaxation du muscle lisse vasculaire.

La cellule endothéliale semble avoir un rôle central dans les changements vasculaires observés dans différentes pathologies. Nous retrouvons cependant moins d'études sur l'implication du muscle lisse vasculaire dans la progression des complications vasculaires et encore moins sur l'intégrité de celui-ci et de ses fonctions relaxantes associées avec la résistance à l'insuline. Nous avons poussé plus loin l'étude du muscle lisse vasculaire pour voir si ce tissu développait des anomalies dans un contexte d'insulinorésistance.

Comme nous l'avons souligné plus haut, l'aorte et de la carotide des animaux résistants à l'insuline conservent leur habilité à relaxer normalement face à une source exogène de NO. En effet, l'utilisation du SNP démontre des relaxations franches et rapides identiques chez les animaux nourris au fructose et les animaux contrôles (Figure10). Le système de la guanylate cyclase dans le muscle lisse vasculaire semble donc intègre et fonctionnel.

Nous avons donc utilisé l'adénosine pour poursuivre l'étude de la relaxation du muscle lisse. Pour ce faire, nous avons utilisé des artères sans endothélium afin d'éliminer toute interférence provenant de ces cellules. L'adénosine n'a pas permis de mettre en évidence des différences entre les rats nourris au fructose et les rats contrôles. En effet, l'affinité ainsi que l'effet maximal demeurent inchangé entre les deux groupes d'animaux (FIGURE 11). L'adénosine est reconnue pour initier une vasorelaxation directe du muscle lisse en stimulant les récepteurs  $A_{2A/2B}$ . On rapporte que l'action de l'adénosine, suite à l'activation des récepteurs  $A_2$ , mène à l'activation de l'adénylate cyclase et à une élévation des taux AMPc intracellulaire (OLSSON et PEARSON, 1990; MUTAFOVA-YAMBOLIEVA et KEEF, 1997). De plus, suite à la stimulation de ces mêmes récepteurs, les canaux potassiques ATP dépendants semblent être impliqués dans l'hyperpolarisation du muscle lisse (AKASUKA *et al.*, 1994; KLEPPISCH et NELSON, 1995). Il semble alors que ces mécanismes ne seraient pas altérés dans la résistance à l'insuline.

La relaxation obtenue avec le salbutamol, un agoniste  $\beta$ -adrénergique, dans l'aorte dévoile par contre une perte de relaxation chez les rats insulino-résistants/hypertendus. La stimulation du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique mène à une hyperpolarisation du muscle lisse par un mécanisme semblable à celui utilisé par l'adénosine, i.e. récepteur  $\beta_2$ -adrénergique/protéine  $G_{\alpha_s}$ /adénylate cyclase/canaux potassiques ATP dépendants (STEKIEL *et al.*, 1993; GOTO *et al.*, 2001). L'effet de la forskoline, un activateur direct de l'adénylate cyclase (DE SOUZA *et al.*, 1983), de l'IBMX, un inhibiteur non spécifique des PDE et du pinacidil, un ouvreur des  $K_{ATP}$ , n'est changée que partiellement chez les rats nourris au fructose. Ceci suggère que la lésion dans la voie de signalisation  $\beta$ -adrénergique se situe possiblement en amont de l'adénylate cyclase. De plus, le salbutamol emprunte une voie de signalisation similaire à celle de l'adénosine, appuyant davantage que la lésion se trouve à proximité du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique. Des pertes de réponse  $\beta_2$ -adrénergique ont déjà été observées dans des modèles d'hypertension. On rapporte entre autre que, l'hyperpolarisation du muscle lisse suite à la stimulation  $\beta_2$ -adrénergique chez les rats SHR, est beaucoup plus faible que chez les contrôles WKY (GOTO *et al.*, 2001). Il a été également démontré chez les SHR que, non seulement la réponse  $\beta_2$ -adrénergique relaxante est diminuée, mais aussi la réactivité à l'adénosine est affectée ainsi que celle de différents agents pharmacologiques reconnus pour activer des récepteurs couplés aux protéines  $G_s$  (ASANO *et al.*, 1988; MASUZAWA *et al.*, 1989). Ces études suggèrent d'ailleurs un mal fonctionnement des protéines G chez les SHR pour expliquer ces résultats. Dans le cas des rats nourris au fructose, il est difficile de proposer ce même mécanisme puisque l'adénosine conserve ces propriétés relaxantes. Un autre mécanisme pourrait expliquer la perte de réactivité adrénérergique par la désensibilisation du récepteur. Le mécanisme par lequel le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique devient moins sensible est assez bien documenté. On rapporte entre autre que la phosphorylation du récepteur diminue sa capacité à initier la signalisation (HAUSDORFF *et al.*, 1990; LEFKOWITZ *et al.*, 1990). De plus, la phosphorylation du récepteur par les kinases des récepteurs couplés aux protéines G (GRK) est reconnue pour avoir un rôle dans la perte de réponse  $\beta_2$ -adrénergique chez les gens hypertendus (GROS *et al.*, 1997). Il y a un nombre important d'études qui apportent des évidences pour expliquer les anomalies de



la réponse  $\beta_2$ -adrénergique reliée à l'hypertension. Notre étude dévoile que l'hypertension associée avec l'insulinorésistance comporte des similarités avec d'autres modèles d'hypertension. La perte de réactivité  $\beta_2$ -adrénergique observée pourrait contribuer au développement de l'hypertension dans le modèle rat nourri au fructose. Il serait intéressant d'étudier davantage le mécanisme de désensibilisation des récepteurs adrénergiques chez les rats nourris au fructose.

Les mécanismes cellulaires post-adénylate cyclase semblent intègres et fonctionnels. On remarque cependant, qu'aux faibles doses de forskoline, l'adénylate cyclase semble avoir une sensibilité accrue (FIGURE 13). Peu d'études rapportent des changements à ce niveau. Les travaux révélant des anomalies dans le fonctionnement de cette enzyme rapportent surtout des pertes d'activité notamment reliées à l'hypertension (ASANO *et al.*, 1988), et aussi dans un modèle animal d'ischémie cérébrale qui possède peu de similarité avec notre modèle animal (NAGAKURA *et al.*, 2002).

En plus de répondre à  $G\alpha_s$  et à la forskoline, les différents isoformes de l'adénylate cyclase peuvent recevoir des signaux de différentes sources dont  $G\alpha_i$  et  $G\beta\gamma$ , de différentes protéines kinases (PKA, PKC, calmoduline kinase), de phosphatase (calcineurine), du calcium et de la calcium/calmoduline (HANOUNE et DEFER, 2001). Ces différents éléments peuvent aussi bien réguler positivement que négativement l'activité de l'enzyme. Par exemple, il est reconnu que PKC possède un effet régulateur positif sur la majorité des isoformes de l'adénylate cyclase (HANOUNE et DEFER, 2001). Cette kinase semble occuper une place importante dans le développement des complications reliées à l'hyperglycémie et au diabète (BROWNLEE, 1991; KOYA et KING, 1998; ISHII *et al.*, 1998; IDRIS *et al.*, 2001; WAY *et al.*, 2001). Alors, puisque les rats nourris au fructose utilisés dans notre étude sont insulinorésistants et hyperglycémiques, il est possible que l'augmentation de sensibilité de la forskoline pour activer l'adénylate cyclase à faible dose dans l'aorte soit reliée à une régulation positive de PKC sur l'adénylate cyclase. Ces fragments d'explication sont bien sûr hypothétiques, mais nous sommes les premiers à mettre en évidence un tel mécanisme et des études plus approfondies devront être faites pour bien comprendre ce phénomène. Il est également

possible que l'AMPc soit dégradée moins vite par les phosphodiésterases (PDE) spécifiques à l'AMPc augmentant l'affinité apparente de la forskoline à faibles doses. L'IBMX, l'inhibiteur des PDE utilisées dans notre étude, est non-spécifique aux différents types de PDE et n'a pas permis de mettre en évidence de différences entre les animaux contrôles et nourris au fructose. Ceci ne signifie pas du tout qu'une sous-population de PDE soit mal régulée dans le contexte physiopathologique. Le pinacidil nous montre dans l'aorte une perte de réactivité chez les animaux nourris au fructose (FIGURE 15-A). Il est difficile de tirer des conclusions avec ce résultat car premièrement il est ardu d'avoir une courbe où plusieurs points montrent un effet relaxant diminué. Dans notre cas, la courbe de relaxation s'étend à peine sur deux logarithmes et seulement un point se retrouve à une concentration intermédiaire. Le reste de la courbe est identique à la courbe des rats contrôles. De plus, la réponse à l'adénosine n'est pas diminuée chez les animaux nourris au fructose suggérant que les  $K_{ATP}$  fonctionnent bien. Ce résultat met peut être à jour une différence dans la relaxation entre le système  $\beta$ -adrénergique et purinergique et l'implication de populations de canaux potassiques différents impliqués dans la relaxation de ces agents pharmacologiques. Malheureusement, les outils pharmacologiques à notre disposition sont limités (ouvreurs de  $K_{ATP}$ ) et des approches différentes (e.g. électrophysiologie) devront être envisagées pour bien comprendre ce phénomène.

Chez le rat nourri au fructose, la perte de relaxation  $\beta_2$ -adrénergique semble toucher plus fortement l'aorte. Les changements sont plus discrets au niveau de la carotide. La raison de cette différence entre les deux vaisseaux de conductance n'est pas claire. Ceci soulève cependant la possibilité que certaines préparations vasculaires soient plus sensibles à développer certains types d'anomalies suite à la diète au fructose. Ceci témoigne aussi peut être d'une fragilité plus grande de l'aorte face aux changements physiologiques qui apparaissent dans ce modèle animal. Cette fragilité pourrait venir par exemple du nombre moins grand de récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques dans cette préparation. La quantité de récepteurs de réserve (spare receptors) dans la carotide pourrait possiblement être plus grande et masquer les changements apportés par la diète au fructose.

Dans cette étude, nous venons de mettre à jour deux troubles dans la relaxation d'un même type de vaisseau. Nous observons une perte de relaxation endothélium dépendante à l'ACh et une perte de relaxation directe du muscle lisse au salbutamol. Ces deux éléments, nous l'avons déjà mentionné, pourraient être des éléments majeurs associés avec l'hypertension. Il semble donc que les causes de l'hypertension soient multifactorielles. Si la perte de réponse du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique est généralisée à travers les tissus, ceci pourrait avoir des répercussions encore plus importantes. Nous retrouvons dans la littérature des résultats qui semblent généraliser cette anomalie du système  $\beta_2$ -adrénergique notamment chez l'humain. En effet, on rapporte que la densité du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique serait diminuée dans le tissu adipeux sous-cutané de femmes obèses (REYNISDOTTIR *et al.*, 1994b). On suggère même que le polymorphisme de ce gène chez l'humain pourrait avoir un rôle dans l'obésité et les anomalies reliées aux cellules adipeuses (LARGE *et al.*, 1997). Les critères de recrutement pour ces études étaient la masse corporelle et ceci rend difficile l'association de cette anomalie avec la résistance à l'insuline. On rapporte cependant un lien entre la perte de réactivité  $\beta_2$ -adrénergique et l'insulinorésistance chez les hommes âgés (REYNISDOTTIR *et al.*, 1994a). On observe également des perturbations au niveau de la lipolyse dans les adipocytes (ENOKSSON *et al.*, 2000) et dans le muscle squelettique en relation avec une perte de signalisation  $\beta_2$ -adrénergique (BLAAK *et al.*, 1994; BLAAK *et al.*, 2004). Ces résultats au niveau de ce tissu sont très intéressants car notre groupe a démontré une perte de perméabilité dans ce tissu (CHAKIR *et al.*, 1998; St-PIERRE *et al.*, 2004). Si la perte de réactivité du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique observée dans les artères de conductance (aorte et carotide) est également présente dans la microcirculation du muscle squelettique, cette situation pourrait potentiellement expliquer la perte de vasoperméabilité chez le rat nourri au fructose.

Nous n'avons pas étudié le récepteur  $\beta_1$ -adrénergique dans notre étude. Si la signalisation de ce récepteur subissait le même sort que  $\beta_2$ , ceci pourrait avoir des répercussions encore plus sérieuses. Or, il appert que le récepteur  $\beta_1$ -adrénergique se retrouve sur les cellules endothéliales et il serait impliqué dans la relâche du monoxyde d'azote (GRAVES et POSTON, 1993). Des études récentes ont confirmé une relation

d'azote (GRAVES et POSTON, 1993). Des études récentes ont confirmé une relation entre l'AMPc et la relâche de NO (LAMPING, 2001). En effet, une élévation d'AMPc dans les cellules endothéliales active la libération de NO via l'activation de la PKA (ZHANG *et al.*, 2001). Cette élévation d'AMPc peut donc se produire en activant le récepteur  $\beta_1$ -adrénergique sur les cellules endothéliales. Or, si la diminution d'activation de ce récepteur est semblable à celle observée au niveau du muscle lisse, on peut s'attendre à une perte d'effet relaxant de la réponse  $\beta$ -adrénergique endothélium-dépendante. Cette hypothèse est peut-être moins importante puisqu'on rapporte que la NOS fonctionne moins bien dans des conditions d'insulinorésistance. L'addition d'anomalies et de lésions peut toutefois mener à des complications plus sévères. Il faudrait donc déterminer l'importance physiologique de la relaxation  $\beta_2$ -adrénergique endothélium-dépendante pour pouvoir tirer quelques conclusions.

Nos résultats décrivent l'aspect multifactoriel des complications vasculaires associées avec l'insulinorésistance. Nous avons montré de nouvelles anomalies vasculaires associées à la résistance à l'insuline. La perte de réactivité  $\beta$ -adrénergique au niveau du muscle lisse démontre que le système vasculaire est touché à différents endroits et que la dysfonction endothéliale n'est pas le seul changement chez les modèles animaux de résistance à l'insuline avec pression artérielle élevée.

## **4.2 Pharmacologie**

### **4.2.1 Relaxation endothélium-dépendante en conditions inhibitrices/L-NNA et indométhacine.**

Dans le but d'étudier davantage la réactivité vasculaire associée à l'insulinorésistance, nous nous sommes intéressés à la relaxation endothélium-dépendante persistante aux inhibiteurs de la NOS (L-NNA) et de la COX (indométhacine). Dans l'aorte et la carotide de rat, l'ACh cause une relaxation endothélium-dépendante qui ne dépasse pas

45% de la contraction initiale obtenue en présence de ces deux inhibiteurs (FIGURE 6). Dans ces conditions, cette relaxation est reconnue pour être produite par l'EDHF chez le rat (HATAKE *et al.*, 1995) et aussi chez le cobaye (PETERSSON *et al.*, 1997). Nos résultats avec l'aorte de rats normaux sont donc en accord avec les études précédentes ayant démontré la présence d'un facteur hyperpolarisant dans cette préparation (CHEN *et al.*, 1988; TAYLOR *et al.*, 1988; HATAKE *et al.*, 1995). Les résultats avec la carotide de rats normaux sont cependant originaux et dévoilent une ubiquité du phénomène. Plusieurs autres études démontrent une telle réponse relaxante à l'ACh dans des artères de différentes espèces, notamment l'artère pulmonaire (CHEN *et al.*, 1988), l'artère mésentérique de rat (HWA *et al.*, 1994; KATAKAM *et al.*, 1999), les coronaires de cobaye (KEEF et BOWEN, 1989), de chien (FELETOU et VANHOUTTE, 1988; HOEFFNER *et al.*, 1989) et de porc (COWAN et COHEN, 1991), ainsi que l'artère mésentérique de chien (KOMORI *et al.*, 1988). D'autres études rapportent par contre que la relaxation endothélium-dépendante est tout à fait abolie par certains analogues de L-arginine (REES *et al.*, 1990; VARGAS *et al.*, 1991). Ces résultats opposés peuvent s'expliquer par la façon dont les tissus sont contractés. Pour réussir à obtenir une relaxation persistante au traitement du L-NNA et d'indométhacine, nous avons utilisé une concentration plus faible de phényléphrine ( $10^{-8}$  M), soit dix fois inférieure à celle que nous utilisons pour les expériences sans inhibiteurs. L'EDHF semble initier la relaxation de façon plus discrète que l'EDRF/NO et demande des conditions particulières pour que l'on puisse observer son effet. L'effet hyperpolarisant est donc visible lorsque la dépolarisation du muscle lisse est plus basse et témoigne de l'efficacité plus faible de l'EDHF à initier un effet relaxant.

La concentration de L-NNA que nous avons utilisée ( $10^{-4}$  M) est pharmacologiquement suffisante pour bloquer l'activité de la eNOS et donc empêcher la production de NO. De plus, les tissus de rats sont reconnus pour être particulièrement sensibles au L-NNA (VARGAS *et al.*, 1991). Dans ces conditions, le taux de GMPc tissulaire demeure similaire au niveau de base et suggère une inhibition complète de l'enzyme NOS (HATAKE *et al.*, 1995). Bien que plusieurs évidences semblent confirmer l'existence de l'EDHF (MOMBOULI et VANHOUTTE, 1997), la polémique persiste toujours. On

rapporte que, malgré la présence de fortes concentrations d'inhibiteurs de NOS, on peut retrouver des traces de NO qui pourraient expliquer la relaxation persistante au L-NNA dans la carotide de lapin (COHEN *et al.*, 1997). Le NO, en plus d'activer la guanylate cyclase, peut directement activer les canaux potassiques (BOLOTINA *et al.*, 1994) et initier, au niveau du muscle lisse, des mécanismes GMPc-indépendants pouvant être responsables de la relaxation sans activer la guanylate cyclase (PLANE *et al.*, 1998; WEISBROD *et al.*, 1998). Il est important de noter que la majorité des ces expériences ont été faites chez le lapin et que la réponse chez le rat peut être très différente. De plus, rien n'indique que les techniques utilisées pour vérifier la présence de NO soient spécifiques à cette molécule. D'autres études seront nécessaires pour clarifier cette ambiguïté.

L'hyperpolarisation observée suite à la stimulation de l'endothélium par différents agonistes est attribuable à l'ouverture des canaux potassiques (GARLAND *et al.*, 1995). Les résultats obtenus suite à la stimulation à l'ACh chez la carotide de rat semblent démontrer la libération d'un facteur impliquant les canaux potassiques. L'amplitude de l'hyperpolarisation est généralement augmentée dans des solutions contenant de faibles concentrations de potassium et diminuée dans des solutions ayant de fortes concentrations de cet ion. Ceci est tout à fait en accord avec nos observations, dans lesquelles, une solution de 20 mM de KCl bloque totalement la relaxation de l'ACh en présence de L-NNA et indométhacine. Chez les artères de rat, cette concentration (20 mM) est reconnue pour inhiber l'hyperpolarisation (CHEN et SUZUKI, 1989; HATAKE *et al.*, 1995; FUKAO *et al.*, 1997). L'utilisation du glibenclamide, un bloqueur de canaux potassique sensible à l'ATP, n'a eu aucun effet sur la relaxation induite par l'ACh en présence d'inhibiteurs (FIGURE 8). Ceci est totalement en accord avec les observations d'études précédentes (FUJII *et al.*, 1992; HATAKE *et al.*, 1995; FUKAO *et al.*, 1997) et suggère que les canaux potassiques sensibles à l'ATP ( $K_{ATP}$ ) ne sont pas impliqués dans l'hyperpolarisation du muscle lisse vasculaire impliquant l'EDHF chez le rat. L'effet de l'ibériotoxine, un bloqueur des canaux potassiques à large conductance ( $BK_{Ca}$ ), diminue davantage la relaxation persistante aux inhibiteurs. Cette découverte intéressante donne un argument supplémentaire à l'implication des canaux potassiques dans la relaxation

endothélium-dépendante en présence d'inhibiteurs sur la carotide. L'application simultanée d'ibériotoxine et d'apamine, un bloqueur des canaux potassiques à faible conductance ( $SK_{Ca}$ ) diminue légèrement la relaxation comparativement à l'ibériotoxine seule et suggère une implication minime des  $SK_{Ca}$  dans ce mécanisme dans la carotide de rat. L'inefficacité de l'apamine et de l'ibériotoxine à abolir complètement la relaxation résistante au traitement L-NNA/indométhacine implique d'autres canaux potassiques ou un mécanisme canaux potassiques indépendant. La littérature rapporte entre autre que, la relaxation attribuable à l'EDHF dans la carotide et l'artère basilaire de cobaye est totalement inhibée par le mélange charybdotoxine/apamine (CORRIU *et al.*, 1996; PETERSSON *et al.*, 1997).

Il est difficile de comparer nos résultats obtenus chez la carotide de rat avec les études ci-haut mentionnées puisque nos résultats avec la charybdotoxine sont non concluants. En effet, pour des raisons obscures, nous avons été incapables d'obtenir des résultats démontrant l'efficacité de cet agent pharmacologique. L'application de la charybdotoxine dans les bains contenant les anneaux de carotide provoquait une activité spontanée irréversible chez cette préparation, ce qui n'était pas observé avec l'ibériotoxine. Des différences de profil d'inhibition entre ces deux bloqueurs ont déjà été observées (PETERSSON *et al.*, 1997), et des cibles différentes ont été proposées. Ces toxines ont une homologie de structure de 68%, et malgré leur similarité, ces molécules possèdent des activités biologiques sur des canaux différents (GIANGIACOMO *et al.*, 1993). La charybdotoxine agit sur les canaux  $BK_{Ca}$  et les  $IK_{Ca}$  alors que l'ibériotoxine est reconnu pour seulement agir sur les  $BK_{Ca}$  (KÖHLER *et al.*, 1996; KOSCHAK *et al.*, 1997; SCHROEDER *et al.*, 2002). Ces précisions sont très utiles à nos études et nous permettent d'affirmer l'implication des  $BK_{Ca}$  dans la relaxation endothélium-dépendante en présence de L-NNA et d'indométhacine dans la carotide de rat.

On doit cependant ne pas oublier que la cellule endothéliale possède également des canaux potassiques et que l'action des toxines utilisées dans cette étude peut avoir un effet sur la réactivité vasculaire (MARCHENKO et SAGE 1996). Par exemple, l'activité spontanée observée avec la charibdotoxine peut provenir du blocage de canaux

potassique (e.g.  $IK_{Ca}$ ) au niveau de la cellule endothéliale et initier des changements de potentiel membranaire qui peuvent avoir une conséquence sur tout le tissu vasculaire. On rapporte dans la littérature que les cellules endothéliales communiquent entre elles par les gap junctions, mais aussi que l'endothélium peut communiquer avec les cellules de muscle lisse de la même façon (CHRIST *et al.*, 1996). Ce réseau peut donc permettre une communication entre les différentes cellules, faciliter l'échange de seconds messagers et mener à des variations de potentiel membranaire qui agiront sur les différents canaux pour influencer le tonus de base.

Puisque la relaxation observée est persistante au L-NNA et à l'indométhacine, nous pouvons attribuer cette relaxation à un facteur autre qu'à l'EDRF/NO et la prostacycline. Des résultats d'électrophysiologie, par exemple, nous permettant d'évaluer le niveau de dépolarisation des membranes, pourraient confirmer nos observations faites à l'aide des essais fonctionnels en bain d'organes isolés. Nous avons cependant des évidences qui, dans la carotide de rat, démontrant bien la libération d'un facteur endothélium dépendant correspondant à l'EDHF. De nouveaux outils pharmacologiques devront être accessibles afin de conduire ces expériences adéquatement. Le clonage de plus en plus fréquent des canaux potassiques permet maintenant de préciser l'effet des différentes toxines sur ces derniers et ceci pourrait apporter une aide considérable pour approfondir nos connaissances sur ce mécanisme (JOINER *et al.*, 1997; VERGARA *et al.*, 1998). Il n'en demeure pas moins que la nature exacte de l'EDHF devra être déterminée et que l'utilisation de plusieurs techniques différentes sera nécessaire pour bien caractériser le mécanisme d'action de l'hyperpolarisation du muscle lisse vasculaire.

#### **4.2.2 Réactivité des agonistes kininergiques sur l'aorte et la carotide de rat**

Nos résultats obtenus avec les kinines sur l'aorte et la carotide de rat montrent que ces autacoïdes sont inactifs sur ces deux artères de conductances (TABLEAU 4). Les résultats dans l'aorte sont en accord avec les résultats obtenus antérieurement dans notre laboratoire. Il avait été observé que l'aorte de rat ne répondait pas à la bradykinine (BARABÉ, 1976). Les kinines sont reconnues pour être les substrats de plusieurs



peptidases comme l'ECA capables de les inactiver (kininase II; GOBEIL, 1998). Malgré la présence de captopril dans ces expériences, l'aorte et la carotide sont demeurés insensibles aux kinines. Même l'utilisation d'analogues synthétiques (LysdesArg<sup>9</sup>bradykinine, Sar[D-Phe<sup>8</sup>]desArg<sup>9</sup>Bk, Phe<sup>8</sup>(CH<sub>2</sub>-NH)Arg<sup>9</sup>Bk) reconnus comme étant plus résistants à la dégradation enzymatique n'a pas permis de mettre en évidence une réactivité quelconque. Nous pouvons cependant exclure l'argument de la dégradation enzymatique des analogues kininergiques pour expliquer l'absence de réponse. Même à des concentrations élevées d'analogue (10<sup>-6</sup> M), nous n'avons pas observé le moindre soubresaut de la part des tissus face à la stimulation des analogues kininergiques. Bien que nous n'ayons pas utilisé un cocktail d'inhibiteurs de protéases complet (nous n'avons pas utilisé le Mergetpa ni le Thiorphan), une application à forte concentration d'analogues kininergiques (10<sup>-6</sup>M) devrait, du moins, initier quelque réaction aussi minime soit-elle. Et puisque nous avons investigué l'effet contractile ainsi que l'effet relaxant des analogues kininergiques, nous pouvons avancer que les récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> sont absents du muscle lisse et de l'endothélium des deux préparations utilisées. Chez les carotides de chien (RHALEB *et al.*, 1988), de porc (GARLAND *et al.*, 1995, RIZZI *et al.*, 1997) et ainsi que l'aorte de lapin (REGOLI et BARABÉ, 1980), des réponses aux kinines dans ont été observés. Il semble donc que cette réactivité soit espèce dépendante. Les kinines ont cependant un effet sur la pression artérielle chez le rat anesthésié, entre autre l'hypotension (GAVRAS *et al.*, 1987; HOLTE *et al.*, 1996; NICOLAU *et al.*, 1996; BJORNSTAD-OSTENSEN *et al.*, 1999). Ceci témoigne probablement d'un effet sur la résistance périphérique. Les kinines sont également capables de dilater l'artère cérébrale chez le rat (ERDOS *et al.*, 2002) et de contracter la veine porte hépatique de rat (REGOLI *et al.*, 1994). La réponse des kinines se manifeste donc dans d'autres lits vasculaires. La carotide et l'aorte ne répondent pas aux agonistes kininergiques.

### **4.2.3 Contraction du muscle lisse.**

#### **4.2.3.1 Phényléphrine**

Les CCR obtenues avec la phényléphrine dans l'aorte dénudée ne démontrent aucune différence au niveau de l'affinité et de l'effet maximal. Ceci suggère que le système  $\alpha$ -adrénergique dans cette préparation ne subit pas d'altération dans le contexte d'insulinorésistance. Ces résultats sont tout à fait en accord avec des études précédentes (IYER et KATOVICH, 1996). On rapporte également que l'effet vasoconstricteur de la norépinéphrine dans l'artère mésentérique de rat nourri au fructose demeure inchangé (VERMA *et al.*, 1997). Il semble donc que les artères de conductances et de résistances conservent leur réactivité face à l'effet presseur adrénergique dans un contexte de résistance à l'insuline. La carotide montre cependant une perte de réactivité chez les animaux nourris au fructose aux faibles doses de phényléphrine. Il est reconnu que le système nerveux autonome est fortement activé dans la résistance à l'insuline et l'hypertension (ROWE *et al.*, 1981; van HELDEN et WOOLRIDGE, 1990). Il est possible que les résultats que nous observons chez la carotide soient une manifestation de désensibilisation de la part des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques chez la carotide des animaux nourris au fructose. L'effet maximal des carotides provenant des deux groupes démontre des amplitudes similaires et suggère que le nombre de récepteurs demeure inchangé.

#### **4.2.3.2 Endothéline**

L'utilisation de l'endothéline dans la comparaison de la réactivité vasculaire entre les animaux sains et ceux insulinorésistants/hypertendus dévoile de légères variations qui sont toutefois non-significatives. En effet, la carotide des rats nourris au fructose possède un  $E_{\max}$  plus élevé que la carotide des rats contrôles. Cette tendance qui se manifeste chez ces animaux provient peut-être d'une augmentation de la quantité de récepteurs  $ET_A$

chez cette préparation (FIGURE 18). Il est difficile d'expliquer pourquoi l'aorte ne suit pas la même tendance que la carotide. Surtout qu'une étude antérieure a justement rapporté une augmentation du nombre de récepteurs ET<sub>A</sub> dans cette préparation (JUAN *et al.*, 1998). Le temps de diète de cette dernière étude était de 40 jours alors que notre protocole était une diète de 28 jours (4 semaines). Ceci pourrait expliquer les différences observées entre les deux études. Des évidences suggèrent aussi que l'hyperinsulinémie pourrait avoir un effet sur la réactivité à l'ET-1 en activant plus fortement la mobilisation calcique via une augmentation des récepteurs ET<sub>A</sub> vasculaires (HOPFNER *et al.*, 1998; JUAN *et al.*, 1998; KATAKAM *et al.*, 2001). Nos résultats ne démontrent pas de tels changements. Ces derniers démontrent par contre un changement au niveau de l'affinité. Les valeurs absolues d'efficacité ( $E_{max}$ ) et d'affinité ( $pEC_{50}$ ) ne démontrent peut-être pas de façon claire des changements qui surviennent au niveau de la réactivité vasculaire de nos animaux (FIGURE 18, TABLEAU 5), mais dans l'aorte la comparaison de l'ordre d'affinité des agonistes laisse entrevoir des changements pourraient avoir une importance dans l'hypertension observée chez les animaux nourris au fructose. En effet, l'ET-1 semble avoir une plus grande affinité dans l'aorte provenant des rats insulino-résistants/hypertendus ( $AngII=ET-1=UroII>Phe$  vs  $ET-1>AngII\geq UroII>Phe$ ; contrôle vs fructose) alors qu'elle est équipotente avec Ang II et Uro-II dans l'aorte des rats contrôles. L'ET-1 est reconnue pour provoquer des contractions lentes et soutenues. Un tel changement dans l'affinité de ce peptide peut donc avoir un effet sur la pression artérielle et expliquer en partie l'hypertension chez les animaux nourris au fructose. Dans de telles circonstances, des taux circulants d'ET-1 normaux pourraient mener à une plus grande réponse et augmenter la pression artérielle. Nous n'avons pas mesuré les taux plasmatiques de l'ET-1, mais des études rapportent que ceux-ci demeurent inchangés chez les animaux nourris au fructose (NAVARRO-CID *et al.*, 1995; JUAN *et al.*, 1998). Des études plus poussées sur le couplage et la voie de signalisation de l'endothéline dans le contexte physiopathologique de la résistance à l'insuline devront être poursuivies pour élargir et interpréter les observations discutées ci-dessus.

#### 4.2.3.3 Angiotensine II

L'utilisation de l'Ang II pour l'étude de la réactivité vasculaire ne nous a pas permis de voir des différences entre les deux groupes de rats. La relation entre l'Ang II et l'hypertension associée avec la résistance à l'insuline demeure encore mal comprise. Les effets bénéfiques des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) et des antagonistes du récepteur AT<sub>1</sub> pour régulariser la pression artérielle et la sensibilité à l'insuline suggèrent un rôle important à l'Ang II dans les complications associées avec la diète au fructose (ERLICH et ROSENTHAL, 1995; HIGASHIURA *et al.*, 2000). On ne sait cependant pas à quel endroit l'Ang II agit dans ce phénomène. On rapporte que les taux plasmatiques d'Ang II sont plus élevés chez le rat nourri au fructose (IYER *et al.*, 1996) et que la densité du récepteur AT<sub>1</sub> est augmentée, notamment dans le ventricule gauche (IYER *et al.*, 1996) et le tissu adipeux (GIACCHETTI *et al.*, 2000). On rapporte dans la littérature un effet transitoire des anomalies reliées à la diète au fructose. L'hyperréactivité vasculaire à l'Ang II est observable dès la deuxième semaine de diète au fructose alors que la réactivité à ce peptide redevient comparable au contrôle à la quatrième semaine (IYER et KATOVICH, 1996a). Cette même équipe rapporte même, au niveau de l'aorte, une perte de récepteur AT<sub>1</sub> après quatre semaines de diète au fructose (IYER *et al.*, 1996). Nos résultats démontrent cependant que la densité réceptorielle demeure inchangée au niveau de l'aorte et de la carotide puisque, l'effet maximal ( $E_{\max}$ ) ne varie pas d'un groupe à l'autre (FIGURE 19). L'effet de l'Ang II sur les paramètres physiologiques observés chez le rat nourri au fructose peut reposer sur des mécanismes autres que l'effet direct de l'octapeptide sur les vaisseaux sanguins. Hwang et collaborateur ont déjà postulé que l'hypertension associée avec la diète au fructose ne provenait pas d'un effet direct du système rénine-angiotensine-aldostérone (HWANG *et al.*, 1989). Il est possible que l'Ang II cause de l'interférence dans la signalisation de l'insuline et que ce changement pourrait en partie être relié à l'insulinorésistance (TOUYZ et SCHIFFRIN, 2000; TOUYZ et BERRY, 2002).

#### 4.2.3.4 Urotensine

L'Uro II humaine n'a pas démontré de différences majeures entre les animaux contrôles et ceux insulino-résistants/hypertendus au niveau de l'aorte. Les différences obtenues chez la carotide sont cependant plus importantes et démontrent une sensibilité plus grande à l'hUro II chez les animaux nourris au fructose. Ceci peut s'expliquer par un système de couplage entre le récepteur et la protéine G plus efficace dans cette préparation. Une variation dans la voie signalisation du récepteur GPR14/UT peut se produire à différents endroits, entre autre au niveau de la mobilisation calcique et ainsi être capable d'initier les mécanismes nécessaires à la contraction avec de faibles concentrations d'agonistes, comme c'est le cas dans la carotide. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier les vaisseaux dans un système pouvant suivre la contraction des tissus en parallèle avec les taux de calcium intracellulaire. Puisque les contractions maximales sont équivalentes entre les deux groupes, il est peu probable que la densité de récepteurs soit changée par la diète au fructose. La vérification des taux circulants de l'urotensine ainsi que le niveau d'expression du récepteur GPR14 servirait grandement à clarifier nos résultats.

Nous avons utilisé le peptide d'origine humaine sur des tissus provenant de rats. Nous ne pouvons toutefois écarter la possibilité que les variations observées proviennent de l'utilisation de la forme humaine de l'undécapeptide. Par contre, il semble que cette possibilité soit peu probable car la partie cyclique du peptide, qui est critique pour l'activité du peptide, est entièrement conservée entre les différentes espèces (DOUGLAS et OHLSTEIN, 2000). De plus, il a été récemment rapporté dans une étude chez le rat éveillé, qu'il n'existe pas de différences dans les effets cardiovasculaires entre l'urotensine II humaine et celle de rat (GARDINER *et al.*, 2001).

Chez le rat normal, on peut observer que les contractions induites par des vasoconstricteurs dans la carotide démontrent une différence dans l'ordre d'efficacité et d'affinité des agonistes contractiles ( $E_{max}$ ; ET-1>AngII=Phe≥Uro vs ET-1>UroII>Phe≥AngII; carotide vs aorte; FIGURE 20, TABLEAU 6). Cette préparation

démontre cependant une réactivité complète face à l'undécapeptide, et comme dans l'aorte, l'Uro II agit comme un agoniste complet. Jusqu'à maintenant chez le rat, l'aorte et la carotide répondent à l'hUro II alors que les lits vasculaires tels que le mésentère et le poumon ne répondent pas que ce soit de façon contractile ou relaxante (GENDRON *et al.*, 2001). Les différences de hUro II observables entre les espèces et les lits vasculaires décrits par notre groupe (CAMARDA *et al.*, 2002) sont peut-être attribuables au différence dans le métabolisme du peptide dans les différents tissus et/ou espèces. Nous avons cependant bien peu d'informations disponibles sur le métabolisme de l'Uro II ainsi que sur les enzymes impliquées dans ce processus pour supporter ou pour refuser cette interprétation. Des études plus avancées seront nécessaires pour fournir suffisamment de connaissances sur cet aspect.

Nous avons déjà démontré (CAMARDA *et al.*, 2002) que différents vasoconstricteurs conservent leurs activités biologiques dans la majorité des tissus isolés alors que la réponse à l'Uro II est marquée par des variations individuelles marquées. Les résultats obtenus sur la carotide de rat complètent en quelque sorte les études antérieures faites par notre groupe. Ces résultats nous mènent à la conclusion que le récepteur GPR14/UT est fonctionnel dans les gros vaisseaux (aorte et carotide) et stimule leurs contractions. Ces observations ont été également faites par d'autres groupes (AMES *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 1999; MORI *et al.*, 1999; NOTHACKER *et al.*, 1999; DAVENPORT et MAGUIRE, 2000) et corroborent les résultats obtenus dans différents lits vasculaires sur lesquels l'undécapeptide est inactif (GENDRON *et al.*, 2001). Ceci soulève donc une question sur le rôle physiologique de l'Uro-II chez les mammifères, mais aussi chez les espèces plus basses dans l'arbre phylogénique des animaux. L'Uro-II est actif dans les larges vaisseaux tels l'aorte et la carotide commune, toutes deux immédiatement situées à la sortie du cœur et de la crosse aortique, alors que d'autres gros vaisseaux situés plus loin du cœur (artère mésentérique, rénale, fémorale ainsi que l'aorte abdominale) demeurent insensibles au peptide (GENDRON *et al.*, 2001; CAMARDA *et al.*, 2002). L'Uro-II pourrait donc prendre part au processus de compliance vasculaire et moduler le volume d'expulsion cardiaque au lieu d'agir sur la résistance vasculaire périphérique. Le profil de contraction de l'hUro II est similaire à celui de l'ET-1 avec des contractions lentes et

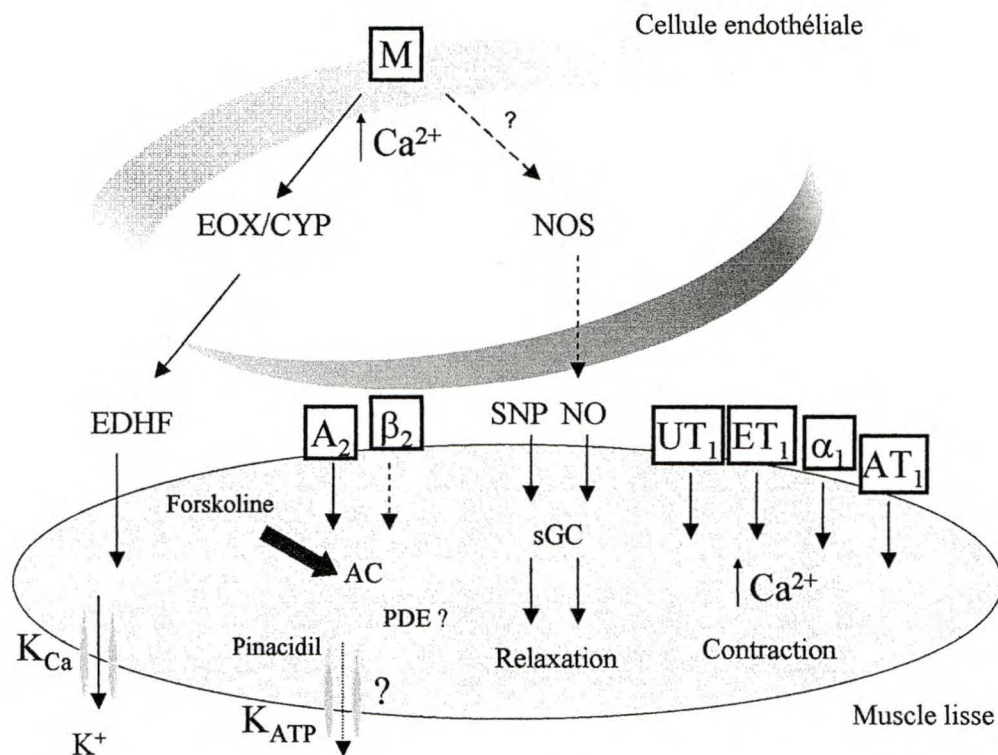
de longues durées. Ceci indique que l'activation du récepteur GPR14/UT peut provoquer une accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique prolongée dans le muscle lisse vasculaire (ITO *et al.*, 1987; GIBSON *et al.*, 1988). Ceci pourrait servir mieux, peut-être, au processus de compliance que celui de la résistance périphérique.

### 4.3 Conclusion

#### **Modèle animal**

L'hypertension associée avec la résistance à l'insuline, chez le rat nourri au fructose, découle probablement de facteurs multiples dont l'un des principaux est la dysfonction endothéliale comme en témoigne la perte de la relaxation NO-dépendante. Puisque les agents pharmacologiques contractiles n'ont pas permis de mettre en évidence des changements significatifs, il semble donc que l'hypertension observée chez le rat nourri au fructose soit associée à une perte de relaxation au niveau des artères du conductance (carotide, aorte et autres). Dans ces vaisseaux, la dysfonction endothéliale semble affecter principalement le système du monoxyde d'azote appuyant ainsi des observations faites antérieurement par d'autres laboratoires. Les études pharmacologiques que nous venons de faire dévoilent que le système  $\beta$ -adrénergique ne semble pas fonctionner de façon optimale pour relaxer la carotide et l'aorte des rats nourris au fructose, et pourrait aussi contribuer à l'effet presseur observé dans ce modèle animal (FIGURE 21). Cette perte de réactivité  $\beta$ -adrénergique représente probablement un mécanisme physiopathologique supplémentaire, cette fois-ci au niveau du muscle lisse, expliquant l'hypertension observée dans le modèle de rat nourri au fructose.

Des études futures pourraient cibler davantage la microcirculation et les effets que peut avoir l'insulinorésistance sur les vaisseaux de résistance. Nous serions en mesure d'évaluer si les vaisseaux de résistance sont également atteints par les mêmes complications chez ce modèle animal. Il serait intéressant de vérifier si le système  $\beta$ -adrénergique subit des altérations dans ces mêmes préparations vasculaires. Un tissu attirant notre attention est, sans aucun doute, le muscle squelettique. En effet, notre



**FIGURE 21** Schéma intégratif des résultats pharmacologiques obtenus dans notre étude.

Ce schéma décrit la réactivité des systèmes étudiés et souligne les différences majeures observées chez les rats nourris au fructose. Les flèches avec les traits unis signifient qu'il n'y a pas de changement, les flèches à traits brisés signifient une perte de réactivité alors que les flèches en gras démontrent une sensibilité accrue chez les animaux nourris au fructose.  $\alpha_1$  : récepteur  $\alpha_1$ -adrénergique,  $A_2$  : récepteur de l'adénosine, AC : adénylate cyclase,  $AT_1$  : récepteur de l'angiotensine II,  $\beta_2$  : récepteur  $\beta_2$ -adrénergique, EDHF : endothelium-derived hyperpolarizing factor,  $ET_1$  : récepteur de l'endothéline, EOX/CYP : epoxygénase cytochrome P450,  $K_{Ca}$  : canaux potassiques calcium dépendant,  $K_{ATP}$  : canaux potassiques ATP dépendant, M : récepteur muscarinique, NOS/NO : monoxyde d'azote synthétase, sGC : guanylate cyclase soluble,  $UT_1$  : récepteur de l'urotensine II.



équipe a déjà démontré une perte de perméabilité vasculaire dans ce tissu (CHAKIR *et al.*, 1998), où la dysfonction endothéliale joue probablement un rôle important. La démonstration de l'implication du récepteur  $\beta_2$  à ces complications (e.g. en perfusant les membres inférieurs de rat nourris au fructose) fournirait des données intéressantes dans la caractérisation de ce phénomène. La perte de sensibilité du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique, ou résistance aux catécholamines, est peut-être le dénominateur commun entre l'hypertension et les anomalies métaboliques reliées à la résistance à l'insuline.

Les différences observées, chez les animaux nourris au fructose, à l'aide de la forskoline sont intéressantes et mériteraient d'être approfondies. L'étude au niveau cellulaire du système AMPc et GMPc pourrait grandement clarifier l'importance du phénomène que nous avons observé. L'étude de l'implication des phosphodiésterases dans ce mécanisme est tout à fait justifiable. Ceci s'avère par contre une tâche difficile, compte tenu des agents pharmacologiques disponibles, de la complexité et du grand nombre d'enzymes dans la famille des phosphodiésterases.

### **Pharmacologie**

L'utilisation de la carotide de rat nous a permis d'observer dans cette préparation vasculaire la libération d'un facteur endothélial ayant les propriétés physiologiques de l'EDHF. En effet, la relaxation à l'ACh, habituellement rapide et très prononcée, se transforme en relaxation lente et moins abrupte en présence de L-NNA et d'indométhacine. Des études d'électrophysiologie sur cette préparation seraient très utiles pour étudier le mécanisme d'action de l'EDHF et pour confirmer le bon fonctionnement de ce vasorelaxant dans les artères de conductance des animaux nourris au fructose. La carotide, un vaisseau de conductance, s'ajoute donc à la liste des préparations où l'EDHF est impliqué dans la physiologie et démontre l'ubiquité de ce mécanisme dans l'arbre vasculaire.

L'étude de la réactivité des agonistes kininergiques, dans la carotide, a démontré que ces peptides étaient inactifs, tout comme dans l'aorte, et suggère que l'effet vasculaire artériel des kinines se situe plutôt en périphérie dans cette espèce. L'étude de la réactivité à

l'urotensine II dans cette même préparation nous a fourni des résultats originaux qui permettent d'étendre nos connaissances sur ce système. Chez le rat, jusqu'à maintenant, seulement l'aorte et la carotide répondent à l'urotensine II. Ceci suggère que les fonctions vasculaires sont limitées dans cette espèce. La carotide de rat se présente donc comme une préparation vasculaire intéressante pour des études pharmacologiques.

## **Remerciements**

Je tiens à remercier en premier lieu et plus d'une fois le Dr Domenico Regoli, m'ayant accueilli dans son laboratoire. Je le remercie pour m'avoir donné la chance de renouer avec la recherche, au financement de ce projet, pour son aide si précieuse à la rédaction de ce document et pour les encouragements durant ces années passées.

Je tiens également à remercier le Dr Pierre Maheux pour son implication dans ce projet ainsi que pour son aide financière.

Je remercie Fernand Gobeil, maintenant professeur au Département de pharmacologie initialement collègue et ami. Fernand a rendu mon intégration au département facile en plus de m'enseigner les bases de la pharmacologie classique. Je le remercie pour les discussions scientifiques que nous avons eues ensemble et pour sa camaraderie exemplaire.

Je remercie Mr Martin Boussougou pour son aide technique et sa camaraderie. Je remercie également Mme Lucie Bouffard pour son aide technique.

Je remercie chaleureusement les autres membres du laboratoire du Dr Regoli, en particulier Stéphanie Hallé, Leng Hong Pheng, Paul-André Blais, Gabrielle Gendron et Witold Neugebauer. Avec ces gens, j'ai passé beaucoup de temps lors de mes études graduées, et, grâce à leur joie de vivre et à leur enthousiasme, j'ai passé d'heureux moments en leur compagnie.

Je remercie les étudiants de l'IPS qui ont su instaurer un climat de camaraderie. Du Département de pharmacologie, je tiens à remercier tout spécialement Stéphane Poirier, Dung Pham, Mirco Plante et Martin Montagne. Du Département de chimie, je tiens à remercier Julie Belzile, Laurence Dubé, André Lescarbeau, Thierry Vidal, Sylvie Beaubien et Elyse Bourque. Sans eux, les moments difficiles auraient été misérables.

Je remercie également les professeurs du Département de pharmacologie pour l'enseignement avec passion de la science. Je remercie spécialement le Dr Alain Cadieux et le Dr Pierre Lavigne pour leurs encouragements.

Je remercie l'Association Diabète Québec pour son support financier pendant mon doctorat.

Je remercie ma famille; Andrée, Fernand, Claudette, Colette, Raymond ainsi que Nathalie, Paul, Lisa-Marie, Jean-Frédéric et Jean-Nicolas. Merci pour vos encouragements, merci de croire en moi et merci pour votre amour.

Et finalement, je remercie Julie, ma compagne de vie depuis déjà une décennie, qui, sans elle, ce document n'aurait pas été écrit. Merci pour ton amour et pour tes inlassables encouragements, merci...

## Références

- Abe H, Yamada N, Kamata K, Kuwaki T, Shimada M, Osuga J, Shionoiri F, Yahagi N, Kadowaki T, Tamemoto H, Ishibashi S, Yazaki Y, Makuuchi M. Hypertension, hypertriglyceridemia, and impaired endothelium-dependent vascular relaxation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *J Clin Invest*. 1998;101:1784-8.
- Akatsuka Y, Egashira K, Katsuda Y, Narishige T, Ueno H, Shimokawa H, Takeshita A. ATP sensitive potassium channels are involved in adenosine A2 receptor mediated coronary vasodilatation in the dog. *Cardiovasc Res*. 1994;28:906-11.
- Alford FP, Martin FL, Pearson MJ. The significance of interpretation of mildly abnormal oral glucose tolerance. *Diabetologia*. 1971;7:173-180.
- Alper J. New insights into type 2 diabetes. *Science*. 2000;289:37-9.
- Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, Loudon CS, Foley JJ, Sauermelch CF, Coatney RW, Ao Z, Disa J, Holmes SD, Stadel JM, Martin JD, Liu WS, Glover GI, Wilson S, McNulty DE, Ellis CE, Elshourbagy NA, Shabon U, Trill JJ, Hay DW, Ohlstein EH, Bergsma DJ, Douglas SA. Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature*. 1999;401:282-6.
- Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B 3rd, Johnson RS, Kahn CR. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*. 1994;372:186-90.
- Asano M, Masuazawa K, Matsuda T. Role of stimulatory GTP-binding protein (Gs) in reduced  $\beta$ -adenoreceptor coupling in the femoral artery of spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. 1988;95:241-51.
- Asano M, Masuazawa K, Matsuda T, Asano T. Decreased responsiveness to  $\beta$ -adenoreceptor agonists in arterial strips from spontaneously hypertensive rats is not associated with alterations in  $\beta$ -adenoreceptors. *Br J Pharmacol*. 1991;9:607-13.
- Avogaro A, Piarulli F, Valerio A, Miola M, Calverì M, Pavan P, Vicini P, Cobelli C, Tiengo A, Calo L, Del Prato S. Forearm nitric oxide balance, vascular relaxation, and glucose metabolism in NIDDM patients. *Diabetes*. 1997;46:1040-6.
- Balon TW, Jasman A, Scott S, Meehan WP, Rude RK, Nadler JL. Dietary magnesium prevents fructose-induced insulin insensitivity in rats. *Hypertension*. 1994;23:1036-9.

Barabé, J. 1976. Étude sur la pharmacologie de la bradykinine. Thèse, Université de Sherbrooke.

Barnett AH. Insulin-sensitizing agents--thiazolidinediones (glitazones). *Curr Med Res Opin.* 2002;18:s31-9.

Barnett M, Collier GR, Collier FM, Zimmet P, O'Dea K. A cross-sectional and short-term longitudinal characterisation of NIDDM in *Psammomys obesus*. *Diabetologia.* 1994;37:671-6.

Baron AD, Brechtel-Hook G, Johnson A, Hardin D. Skeletal muscle blood flow. A possible link between insulin resistance and blood pressure. *Hypertension.* 1993;21:129-35.

Bauersachs J, Popp R, Hecker M, Sauer E, Fleming I, Busse R. Nitric oxide attenuates the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circulation.* 1996;94:3341-7.

Baumann CA, Ribon V, Kanzaki M, Thurmond DC, Mora S, Shigematsu S, Bickel PE, Pessin JE, Saltiel AR. CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature.* 2000;407:202-7.

Beckman JS et Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996;271:C1424-37.

Bergenstal RM, Cohen RM, Lever E, Polonsky K, Jaspan J, Blix PM, Revers R, Olefsky JM, Kolterman O, Steiner K. The metabolic effects of biosynthetic human proinsulin in individuals with type I diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 1984;58:973-9.

Berridge MJ, Irvine RF. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature.* 1989;341:197-205.

Bezerra RM, Ueno M, Silva MS, Tavares DQ, Carvalho CR, Saad MJ. A high fructose diet affects the early steps of insulin action in muscle and liver of rats. *J Nutr.* 2000;130:1531-5.

Bjornstad-Ostensen A, Holte HR, Berg T. Amplification of kinin-induced hypotension by nitric oxide synthesis in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1997;29:53-7.

Blaak EE, Schiffrers SL, Saris WH, Mensink M, Kooi ME. Impaired beta-adrenergically mediated lipolysis in skeletal muscle of obese subjects. *Diabetologia.* 2004;47:1462-8.

Blaak EE, Van Baak MA, Kemerink GJ, Pakbiers MT, Heidendal GA, Saris WH. Beta-adrenergic stimulation of energy expenditure and forearm skeletal muscle metabolism in lean and obese men. *Am J Physiol.* 1994;267:E306-15.

- Blais V, Fugere M, Denault JB, Klarskov K, Day R, Leduc R. Processing of proendothelin-1 by members of the subtilisin-like pro-protein convertase family. *FEBS Lett.* 2002;524:43-8.
- Blakely S. R., Hallfrisch J., Reiser S., Prather E. Long-term effects of moderate fructose feeding on glucose tolerance parameters in rats. *J. Nutr.* 1981;111:307-14.
- Bolzan AD et Bianchi MS. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res.* 2002;512:121-34.
- Bonora E, Zavaroni I, Alpi O, Pezzarossa A, Bruschi F, Dall'Aglio E, Guerra L, Coscelli C, Butturini U. Relationship between blood pressure and plasma insulin in non-obese and obese non-diabetic subjects. *Diabetologia.* 1987;30: 719-23.
- Brands MW, Garrity CA, Holman MG, Keen HL, Alonso-Galicia M, Hall JE. High-fructose diet does not raise 24-hour mean arterial pressure in rats. *Am J Hypertens.* 1994;7:104-9.
- Brindley DN et Russell JC. Animal models of insulin resistance and cardiovascular disease : some therapeutic approaches using the JCR:LA-cp rat. *Diabetes Obes Metab.* 2002;4:1-10.
- Brodde OE, Daul AE, O'Hara N, Khalifa AM. Properties of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adenoreceptors in circulating blood cells of patients with essential hypertension. *J cardiovasc Pharmacol.* 1985;7:S162-7.
- Brownlee M. Glycosylation products as toxic mediators of diabetic complications. *Annu Rev Med.* 1991;42:159-66.
- Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest.* 1991;87: 432-8.
- Bucala R, Makita Z, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H. Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 1993;90:6434-8.
- Buhimschi IA, Shi SQ, Saade GR, Garfield RE. Marked variation in responses to long-term nitric oxide inhibition during pregnancy in outbred rats from two different colonies. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;184:686-93.
- Callow MJ, Verstuyft J, Tangirala R, Palinski W, Rubin EM. Atherogenesis in transgenic mice with human apolipoprotein B and lipoprotein (a). *J Clin Invest.* 1995;96:1639-46.
- Camarda V, Rizzi A, Calo G, Gendron G, Perron SI, Kostenis E, Zamboni P, Mascoli F, Regoli D. Effects of human urotensin II in isolated vessels of various species;

comparison with other vasoactive agents. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2002;365:141-9.

Cerami A, Vlassara H, Brownlee M. Role of nonenzymatic glycosylation in atherogenesis. *J Cell Biochem.* 1986;30:111-20.

Chakir M, Plante GE, Maheux P. Reduction of capillary permeability in the fructose-induced hypertensive rat. *Am J Hypertens.* 1998;11:563-9.

Chan SJ, Keim P, Steiner DF. Cell-free synthesis of rat preproinsulins: characterization and partial amino acid sequence determination. *Proc Natl Acad Sci.* 1976;73:1964-8.

Cheetham C, Collis J, O'Driscoll G, Stanton K, Taylor R, Green D. Losartan, an angiotensin type 1 receptor, improves endothelial function in non-insulin-dependent diabetes. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36:1461-6.

Chen G, Suzuki H, Weston AH. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br J Pharmacol.* 1988;95:1165-74.

Chen G et Suzuki H. Some electrical properties of the endothelium-dependent hyperpolarization recorded from rat arterial smooth muscle cells. *J Physiol.* 1989;410:91-106.

Chen S, Kashiwabara H, Kosegawa I, Ishii J, Katayama S. Bradykinin may not be involved in improvement of insulin resistance by angiotensin converting enzyme inhibitor. *Clin Exp Hypertens.* 1996;18:625-36.

ChenY-DI et Reaven GM. Insulin resistance and atherosclerosis. *Diabetes Reviews.* 1997;5: 331-42.

Christ GJ, Spray DC, el-Sabban M, Moore LK, Brink PR. Gap junctions in vascular tissues. Evaluating the role of intercellular communication in the modulation of vasomotor tone. *Circ Res.* 1996;79:631-46.

Chevalier M, Wiley JH, Leveille GA. The age-dependent response of serum triglycerides to dietary fructose. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1972;139:220-2.

Clark JB, Palmer CJ, Shaw WN. The diabetic Zucker fatty rat. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1983;173:68-75.

Considine RV, Nyce MR, Allen LE, Morales LM, Triester S, Serrano J, Colberg J, Lanza-Jacoby S, Caro JF. Protein kinase C is increased in the liver of humans and rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus: an alteration not due to hyperglycemia. *J Clin Invest.* 1995;95:2938-44.



- Corriu C, Feletou M, Canet E, Vanhoutte PM. Endothelium-derived factors and hyperpolarization of the carotid artery of the guinea-pig. *Br J Pharmacol.* 1996;119:959-64.
- Corriu C, Feletou M, Puybasset L, Bea ML, Berdeaux A, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization in isolated arteries taken from animals treated with NO-synthase inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;32:944-50.
- Coulouarn Y, Lihrmann I, Jegou S, Anouar Y, Tostivint H, Beauvillain JC, Conlon JM, Bern HA, Vaudry H. Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci.* 1998;95:15803-8.
- Cowan CL et Cohen RA. Two mechanisms mediate relaxation by bradykinin of pig coronary artery: NO-dependent and -independent responses. *Am J Physiol.* 1991;261:H830-5.
- Davenport AP et Maguire JJ. Urotensin II: fish neuropeptide catches orphan receptor. *Trends Pharmacol Sci.* 2000;21:80-2.
- DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol.* 1979;237:E214-23.
- DeFronzo RA. The effect of insulin on renal sodium metabolism: A review with clinical implication. *Diabetologia.* 1981;21:165-71.
- Hyslop S et De Nucci G. Vasoactive mediators released by endothelins. *Pharmacol Res.* 1992;26:223-42.
- Derubertis FR et Craven PA. Activation of protein kinase C in glomerular cells in diabetes. Mechanisms and potential links to the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Diabetes.* 1994;43:1-8.
- De Souza NJ, Dohadwalla AN, reden J. Forskolin: a labdane diterpenoid with antihypertensive, positive inotropic, platelet aggregation inhibitory and adenylate cyclase-activating properties. *Med Res Rev.* 1983;3:201-19.
- De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Brit J Pharmacol.* 2000;130:963-74.
- Dorigo P, Fraccarollo D, Santostasi G, Maragno I. Impairment of endothelium-dependent but not of endothelium-independent dilatation in guinea-pig aorta rings incubated in the presence of elevated glucose. *Br J Pharmacol.* 1997;121:972-6.

D'Orléans-Juste P, Lidbury PS, Telemaque S, Warner TD, Vane JR. Human big endothelin releases prostacyclin *in vivo* and *in vitro* through a phosphoramidon-sensitive conversion to endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1991;17:S251-5.

Douglas SA, Beck GR Jr, Elliott JD, Ohlstein EH. Pharmacological evidence for the presence of three distinct functional endothelin receptor subtypes in the rabbit lateral saphenous vein. *Br J Pharmacol*. 1995;114:1529-40.

Douglas SA et Ohlstein EH. Human urotensin-II, the most potent mammalian vasoconstrictor identified to date, as a therapeutic target for the management of cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med*. 2000;10:229-37.

Douglas SA, Tayara L, Ohlstein EH, Halawa N, Giaid A. Congestive heart failure and expression of myocardial urotensin II. *Lancet* 2002;359:1990-7.

Drake PG et Posner BI. Insulin receptor-associated protein tyrosine phosphatase(s): role in insulin action. *Mol Cell Biochem*. 1998;182:79-89.

Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest*. 2001;108:1341-8.

Engelman JA, Berg AH, Lewis RY, Lisanti MP, Scherer PE. Tumor necrosis factor alpha-mediated insulin resistance, but not dedifferentiation, is abrogated by MEK1/2 inhibitors in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol*. 2000;14:1557-69.

Enoksson S, Talbot M, Rife F, Tamborlane WV, Sherwin RS, Caprio S. Impaired *in vivo* stimulation of lipolysis in adipose tissue by selective beta2-adrenergic agonist in obese adolescent girls. *Diabetes*. 2000;49:2149-53.

Erdos B, Miller AW, Busija DW. Impaired endothelium-mediated relaxation in isolated cerebral arteries from insulin-resistant rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;282:H2060-5.

Erllich Y et Rosenthal T. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on fructose induced hypertension and hyperinsulinaemia in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl*. 1995;22:S347-9.

Erllich Y et Rosenthal T. Contribution of nitric oxide to the beneficial effects of enalapril in the fructose-induced hyperinsulinemic rat. *Hypertension*. 1996;28:754-7.

Erllich Y et Rosenthal T. Contribution of bradykinin to the beneficial effects of ramipril in the fructose-fed rat. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998;31:581-4.

Erllich Y, Mayk A, Rosenthal T. Nitric oxide does not participate in the metabolic effects of exogenous bradykinin in fructose-fed rats. *Am J Hypertens*. 2001;14:3-6.

- Faure P, Rossini E, Wiernsperger N, Richard MJ, Favier A, Halimi S. An insulin sensitizer improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity in high fructose-fed rats. *Diabetes*. 1999;48:353-7.
- Feletou M et Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 1988;93:515-24.
- Ferrannini E, Buzzigoli G, Bonadonna R, Giorico MA, Oleggini M, Graziadei L, Pedrinelli R, Brandi L, Bevilacqua S. Insulin resistance in essential hypertension. *N Engl J Med*. 1987;15: 350-7.
- Ferrario CM. The renin-angiotensin system: importance in physiology and pathology. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1990;15:S1-5.
- Finegood DT, McArthur MD, Kojwang D, Thomas MJ, Topp BG, Leonard T, Buckingham RE. Beta-cell mass dynamics in Zucker diabetic fatty rats. Rosiglitazone prevents the rise in net cell death. *Diabetes*. 2001;50:1021-9.
- Fleming I et Busse R. NO: the primary EDRF. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31:5-14.
- Fu MX, Wells-Knecht KJ, Blackledge JA, Lyons TJ, Thorpe SR, Baynes JW. Glycation, glycooxidation, and cross-linking of collagen by glucose. Kinetics, mechanisms, and inhibition of late stages of the Maillard reaction. *Diabetes*. 1994;43:676-83.
- Fujii K, Tominaga M, Ohmori S, Kobayashi K, Koga T, Takata Y, Fujishima M. Decreased endothelium-dependent hyperpolarization to acetylcholine in smooth muscle of the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Circulation Research*. 1992;70:660-9.
- Fukao M, Hattori Y, Kanno M, Sakuma I, Kitabatake A. Alterations in endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries from streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol*. 1997;121:1383-91.
- Furchgott RF et Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J*. 1989;3:2007-18.
- Gardiner SM, March JE, Kemp PA, Davenport AP, Bennett T. Depressor and regionally-selective vasodilator effects of human and rat urotensin II in conscious rats. *Br J Pharmacol*. 2001;132:1625-9.
- Garland CJ, Plane F, Kemp BK, Cocks TM. Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *Trends Pharmacol Sci*. 1995;16:23-30.
- Gavras H, Benetos A, Gavras I. Contribution of bradykinin to maintenance of normal blood pressure. *Hypertension*. 1987;9:147-9.

Gendron G, D'Orléans Juste P, Regoli D. Comparison of pharmacological effects of ET-1 and Urotensine II *in vivo* and *in vitro* in the rat. 2001; ET-7 meeting, Edinburgh, 16-19 septembre.

Giacchetti G, Sechi LA, Griffin CA, Don BR, Mantero F, Schambelan M. The tissue renin-angiotensin system in rats with fructose-induced hypertension: overexpression of type 1 angiotensin II receptor in adipose tissue. *J Hypertens*. 2000;18:695-702.

Giangiacomo KM, Sugg EE, Garcia-Calvo M, Leonard RJ, McManus OB, Kaczorowski GJ, Garcia ML. Synthetic charybdotoxin-iberiotoxin chimeric peptides define toxin binding sites on calcium-activated and voltage-dependent potassium channels. *Biochemistry*. 1993;32:2363-70.

Gibson A, Conyers S, Bern HA. The influence of urotensin II on calcium flux in rat aorta. *J Pharm Pharmacol*. 1988;40:893-5.

Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest*. 2000;106:453-8.

Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complication. *Diabetes Care*. 1996;19:257-67.

Gobeil, F. Jr. 1998. Caractérisation pharmacologique du récepteur B1 humain des kinines et de ses antagonistes. Thèse, Université de Sherbrooke.

Goldfine ID, Maddux BA, Youngren JF, Trischitta V, Frittitta L. Role of PC-1 in the etiology of insulin resistance. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;892:204-22.

Goldstein BJ, Ahmad F, Ding W, Li PM, Zhang WR. Regulation of the insulin signalling pathway by cellular protein-tyrosine phosphatases. *Mol Cell Biochem*. 1998;182:91-9.

Goto K, Kasuya Y, Matsuki N, Takuwa Y, Kurihara H, Ishikawa T, Kimura S, Yanagisawa M, Masaki T. Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive, voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci*. 1989;86:3915-8.

Goto K, Fujii K, Abe I. Impaired beta-adrenergic hyperpolarization in arteries from prehypertensive spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2001;37:609-13.

Graves J, et Poston L.  $\beta$ -Adrenoreceptors agonist mediated relaxation of rat isolated resistance arteries: a role for the endothelium and nitric oxide. *Br J Pharmacol*. 1993;108:631-7.

Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B, Alexander RW. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension*. 1997;29:366-73.

- Gros R, Benovic JL, Tan CM, Feldman RD. G-Protein-coupled receptor kinase activity is increased in hypertension. *J Clin Invest*. 1997;99:2088-93.
- Guo X, Liu WL, Chen LW, Guo ZG. High glucose impairs endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta. *Acta Pharmacol Sin*. 2000;21:169-73.
- Gutman RA, Basilico MZ, Bernal CA, Chicco A, Lombardo YB. Long-term hypertriglyceridemia and glucose intolerance in rats fed chronically an isocaloric sucrose-rich diet. *Metabolism*. 1987;36:1013-20.
- Guyton AC. The relationship of cardiac output and arterial pressure control. *Circulation*. 1981;64:1079-88.
- Hakonarson, H., D. J. Herrick, P. G. Serrano, and M. M. Grunstein. 1996. Mechanism of cytokine-induced modulation of  $\beta$ -adrenoceptor responsiveness in airway smooth muscle. *J Clin Invest* 97: 2593-2600.
- Hanoune J et Defer N. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:145-74.
- Hamaty M, Lamberti M, Sowers JR. Diabetic vascular disease and hypertension. *Curr Opin Cardiol*. 1998;13:298-303.
- Hatake K, Wakabayashi I, Hishida S. Endothelium-dependent relaxation to  $N^G$ -nitro-L-arginine in rat aorta. *European J Pharmacol*. 1995;24:25-32.
- Hausdorff WP, Caron MG, LefkowitzmRJ. Turning off the signal: desensitization of b-adrenergic receptor function. *FASEB*. 1990;4:2881-9.
- Higaki Y, Wojtaszewski JF, Hirshman MF, Withers DJ, Towery H, White MF, Goodyear LJ. Insulin receptor substrate-2 is not necessary for insulin- and exercise-stimulated glucose transport in skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1999;274:20791-5.
- Higashiura K, Ura N, Takada T, Li Y, Torii T, Togashi N, Takada M, Takizawa H, Shimamoto K. The effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor and an angiotensin II receptor antagonist on insulin resistance in fructose-fed rats. *Am J Hypertens*. 2000;13:290-7.
- Himsworth HP et Kerr BB. Insulin-sensitive and insulin-insensitive types of diabetes mellitus. *Clin Sci*. 1939;4:119-52.
- Hobart PM, Fogliano M, O'Connor BA, Schaefer IM, Chirgwin JM. Human renin gene: structure and sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci*. 1984;81:5026-30.

- Hoeffner U, Feletou M, Flavahan NA, Vanhoutte PM. Canine arteries release two different endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol.* 1989;257:H330-3.
- Holte HR, Bjornstad-Ostensen A, Berg T. The role of endogenous bradykinin in blood pressure homeostasis in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 1996;118:1925-30.
- Honing MLH, Morisson PJ, Stroes ESG, Rabelink TJ. Endothelial function in diabetes : a disturbed vascular balance. *International Diabetes Reviews* 1999;March: 6-9.
- Hopfner RL, Hasnadka RV, Wilson TW, McNeill JR, Gopalakrishnan V. Insulin increases endothelin-1-evoked intracellular free calcium responses by increased ET(A) receptor expression in rat aortic smooth muscle cells. *Diabetes* 1998;47:937-44.
- Hwa JJ, Ghibaudi L, Williams P, Chatterjee M. Comparison of acetylcholine-dependent relaxation in large and small arteries of rat mesenteric vascular bed. *Am J Physiol.* 1994;266:H952-8.
- Hwang I-S, Ho H, Hoffman BB, Reaven GM. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension* 1987;10: 512-6.
- Hwang IS, Huang WC, Wu JN, Shian LR, Reaven GM. Effect of fructose-induced hypertension on the renin-angiotensin-aldosterone system and atrial natriuretic factor. *Am J Hypertens.* 1989;2:424-7.
- Hyakukoku M, Higashiura K, Ura N, Murakami H, Yamaguchi K, Wang L, Furuhashi M, Togashi N, Shimamoto K. Tissue-specific impairment of insulin signaling in vasculature and skeletal muscle of fructose-fed rats. *Hypertens Res.* 2003;26:169-76.
- Ido Y, Vindigni A, Chang K, Stramm L, Chance R, Heath WF, DiMarchi RD, Di Cera E, Williamson JR. Prevention of vascular and neural dysfunction in diabetic rats by C-peptide. *Science.* 1997;277:563-6.
- Idris I, Gray S, Donnelly R. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia.* 2001;44:659-73.
- Ignarro LJ et Kadowitz PJ. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1985;25:171-91.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci.* 1987;84:9265-9.
- Imura O, Shimamoto K, Matsuda K, Masuda A, Takizawa H, Higashiura K, Miyazaki Y, Hirata A, Ura N, Nakagawa M. Effects of angiotensin receptor antagonist and

angiotensin converting enzyme inhibitor on insulin sensitivity in fructose-fed rats and essential hypertensives. *Am J Hypertens*. 1995;8: 352-7.

Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci*. 1989;86:2863-7.

Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin JC, Smith CD, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys*. 1992;298:431-7.

Ishii H, Koya D, King GL. Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *J Mol Med*. 1998;76:21-31.

Itoh H, McMaster D, Lederis K. Functional receptors for fish neuropeptide urotensin II in major rat arteries. *Eur J Pharmacol*. 1988;149:61-6.

Iwamuro Y, Miwa S, Zhang XF, Minowa T, Enoki T, Okamoto Y, Hasegawa H, Furutani H, Okazawa M, Ishikawa M, Hashimoto N, Masaki T. Activation of three types of voltage-independent Ca<sup>2+</sup> channel in A7r5 cells by endothelin-1 as revealed by a novel Ca<sup>2+</sup> channel blocker LOE 908. *Br J Pharmacol*. 1999;126:1107-14.

Iyer SN et Katovich MJ. Vascular reactivity to phenylephrine and angiotensin II in hypertensive rats associated with insulin resistance. *Clin Exp Hypertens*. 1996a;18:227-42.

Iyer SN et Katovich MJ. Fructose feeding in rats is not associated with sodium retention. *Am J Hypertens*. 1996b;9:1018-23.

Iyer SN, Katovich MJ, Raizada MK. Changes in angiotensin AT1 receptor density during hypertension in fructose-fed rats. *Adv Exp Med Biol*. 1996;396:49-58.

January B, Seibold A, Allal C, Whaley BS, Knoll BJ, Moore RH, Dickey BF, Barber R, Clark RB. Salmeterol-induced desensitization, internalization and phosphorylation of the human beta2-adrenoceptor. *Br J Pharmacol*. 1998;123:701-11.

Jeffrey S. Thresher, Deborah A. Podolin, Yuren Wei, Robert S. Mazzeo, and Michael J. Pagliassotti. Comparison of the effects of sucrose and fructose on insulin action and glucose tolerance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000;279:R1334-40.

Jiang ZY, Lin YW, Clemont A, Feener EP, Hein KD, Igarashi M, Yamauchi T, White MF, King GL. Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats. *J Clin Invest*. 1999;104:447-57.

Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, Cusco JA, Lee BK, Creager MA. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation*. 1993;88:2510-6.

Joiner WJ, Wang LY, Tang MD, Kaczmarek LK. hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci*. 1997;94:11013-8.

Jokl R et Colwell JA. Arterial thrombosis and atherosclerosis in diabetes. *Diabetes Reviews*. 1997;5:316-30.

Juan CC, Fang VS, Hsu YP, Huang YJ, hsia DB, Yu PC, Kwok CF, Ho LT. Overexpression of vascular endothelin-1 and endothelin-A receptors in a fructose-induced hypertension rat model. *J Hypertens*. 1998;16:1775-82.

Kahn CR. Insulin receptors and insulin signaling in normal and disease states. *International Textbook of Diabetes Mellitus* (2<sup>ième</sup> édition). John Wiley & Sons Ltd, 1997, pp 437-67.

Kamide K, Rakugi H, Higaki J, Okamura A, Nagai M, Moriguchi K, Ohishi M, Satoh N, Tuck ML, Ogihara T. The renin-angiotensin and adrenergic nervous system in cardiac hypertrophy in fructose-fed rats. *Am J Hypertens*. 2002;15:66-71.

Kashiwagi A, Shinosaki K, Hishio Y, Okamura T, Toda N, Kikkawa R. Free radical production in endothelial cells as a pathogenic factor for vascular dysfunction in the insulin resistance state. *Diabetes Res Clin Pract*. 1999;45 : 199-203.

Katakam PV, Ujhelyi MR, Miller AW. EDHF-mediated relaxation is impaired in fructose-fed rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999;34:461-7.

Katakam PV, Pollock JS, Pollock DM, Ujhelyi MR, Miller AW. Enhanced endothelin-1 response and receptor expression in small mesenteric arteries of insulin-resistant rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H522-7.

Katovich MJ, Reaves PY, Francis SC, Pachori AS, Wang HW, Raizada MK. Gene therapy attenuates the elevated blood pressure and glucose intolerance in an insulin-resistant model of hypertension. *J Hypertens*. 2001;19:1553-8.

Katugampola SD, Maguire JJ, Kuc RE, Wiley KE, Davenport AP. Discovery of recently adopted orphan receptors for apelin, urotensin II, and ghrelin identified using novel radioligands and functional role in the human cardiovascular system. *Can J Physiol Pharmacol*. 2002;80:369-74.

Keef KD, et Bowen SM. Effect of ACh on electrical and mechanical activity in guinea pig coronary arteries. *Am J Physiol*. 1989;257:H1096-103.



- Kim JK, Kim YJ, Fillmore JJ, Chen Y, Moore I, Lee J, Yuan M, Li ZW, Karin M, Perret P, Shoelson SE, Shulman GI. Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest*. 2001;108:437-46.
- Klee CB.  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent phospholipid- (and membrane-) binding proteins. *Biochemistry*. 1988;27:6645-53.
- Kleppisch T et Nelson MT. Adenosine activates ATP-sensitive potassium channels in arterial myocytes via  $\text{A}_2$  receptors and cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci*. 1995;92:12441-5.
- Kohler M, Hirschberg B, Bond CT, Kinzie JM, Marrion NV, Maylie J, Adelman JP. Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science*. 1996;273:1709-14.
- Komori K, Loreny RR, Vanhoutte PM. Nitric oxide, Ach and electrical and mechanical properties of canine arterial smooth muscle. *Am J Physiol*. 1988;255:H207-12.
- Koschak A, Koch RO, Liu J, Kaczorowski GJ, Reinhart PH, Garcia ML, Knaus HG. [ $^{125}\text{I}$ ]Iberitoxin-D19Y/Y36F, the first selective, high specific activity radioligand for high-conductance calcium-activated potassium channels. *Biochemistry*. 1997;36:1943-52.
- Koya D et King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*. 1998;47:859-66.
- Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, Chabielska E, Buczek W. Angiotensin-(1-7): an active member of the renin-angiotensin system. *J Physiol Pharmacol*. 2002;53:533-40.
- Kulkarni RN, Bruning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson MA, Kahn CR. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell*. 1999;96:329-39.
- Kunisaki M, Bursell SE, Umeda F, Nawata H, King GL. Normalization of diacylglycerol-protein kinase C activation by vitamin E in aorta of diabetic rats and cultured rat smooth muscle cells exposed to elevated glucose levels. *Diabetes*. 1994;43:1372-7.
- Lamping K. Interaction between NO and cAMP in the regulation of vascular tone. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:729-30.
- Lange U, Löffler-Walz C, Englert HC, Hambrock A, Russ U, Quast U. The stereoisomers of a pinacidil analog open or close cloned ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channels. *J Biol Chem* 2002;277:40196-205.

- Laporte S, Denault JB, D'Orleans-Juste P, Leduc R. Presence of furin mRNA in cultured bovine endothelial cells and possible involvement of furin in the processing of the endothelin precursor. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993;22:S7-10.
- Large V, Hellstrom L, Reynisdottir S, Lonnqvist F, Eriksson P, Lannfelt L, Arner P. Human beta-2 adrenoceptor gene polymorphisms are highly frequent in obesity and associate with altered adipocyte beta-2 adrenoceptor function. *J Clin Invest*. 1997;100:3005-13.
- Lassègue B, Alexander RW, Clark M, Akers M, Griendling KK. Phosphatidylcholine is a major source of phosphatidic acid and diacylglycerol in angiotensin II-stimulated vascular smooth-muscle cells. *Biochem J*. 1993;292:509-17.
- Lawn RM, Wade DP, Hammer RE, Chiesa G, Verstuyft JG, Rubin EM. Atherogenesis in transgenic mice expressing human apolipoprotein(a). *Nature*. 1992;17:670-2.
- Lee DH, Lee JU, Kang DG, Paek YW, Chung DJ, Chung MY. Increased vascular endothelin-1 gene expression with unaltered nitric oxide synthase levels in fructose-induced hypertensive rats. *Metabolism*. 2001;50:74-8.
- Lefkowitz RJ, Hausdorff WP, Caron MG. Role of phosphorylation in desensitization of the  $\beta$ -Adenoreceptors. *Trends Pharmacol Sci*. 1990;11:190-94.
- Leeuwenburgh C, Hardy MM, Hazen SL, Wagner P, Oh-ishi S, Steinbrecher UP, Heinecke JW. Reactive nitrogen intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human atherosclerotic intima. *J Biol Chem*. 1997;272:1433-6.
- Levi B et Werman MJ. Long-term fructose consumption accelerates glycation and several age-related variables in male rats. *J Nutr*. 1998;128:1442-9.
- Li H et Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol*. 2000;190:244-54.
- Lin WW, Lee CY, Chuang DM. Endothelin- and sarafotoxin-induced phosphoinositide hydrolysis in cultured cerebellar granule cells: biochemical and pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther*. 1991;257:1053-61.
- Liu Q, Pong SS, Zeng Z, Zhang Q, Howard AD, Williams DL Jr, Davidoff M, Wang R, Austin CP, McDonald TP, Bai C, George SR, Evans JF, Caskey CT. Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR14. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;266:174-8.
- Lucas, CP, Estigarribia JA, Darga LL, Reaven GM. Insulin and blood pressure in obesity. *Hypertension*. 1985;7: 702-706.

- Maddux BA, Sbraccia P, Kumakura S, Sasson S, Youngren J, Fisher A, Spencer S, Grupe A, Henzel W, Stewart TA. Membrane glycoprotein PC-1 and insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*. 1995;373:448-51.
- Maguire JJ et Davenport AP. Is urotensin-II the new endothelin? *Br J Pharmacol*. 2002;137:579-88.
- Manitius J, Baines AD, Roszkiewicz A. The effect of high fructose intake on renal morphology and renal function in rats. *J Physiol Pharmacol*. 1995;46:179-83.
- Marchenko SM et Sage SO. Calcium-activated potassium channels in the endothelium of intact rat aorta. *J Physiol*. 1996;492:53-60.
- Mastick CC, Brady MJ, Saltiel AR. Insulin stimulates the tyrosine phosphorylation of caveolin. *J Cell Biol*. 1995;129:1523-31.
- Masuzawa K, Matsuda T, Asano M. Decreased arterial responsiveness to multiple cyclic AMP-generating receptor agonists in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. 1989;96:227-35.
- Mayer B et Hemmens B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci*. 1997;22:477-81.
- McDaniel NL, Rembold CM, Murphy RA. Cyclic nucleotide dependent relaxation in vascular smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol*. 1994;72:1380-5.
- McVeigh GE, Brennan GM, Johnston GD, McDermott BJ, McGrath LT, Henry WR, Andrews JW, Hayes JR. Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1992;35:771-6.
- Miatello RM, Damiani MT, Nolly. HL. Cardiovascular kinin-generating capability in hypertensive fructose-fed rats. *J Hypertens*. 1998;16:1273-7.
- Miatello R, Risler N, Castro C, Gonzalez S, Ruttler M, Cruzado M. Aortic smooth muscle cell proliferation and endothelial nitric oxide synthase activity in fructose-fed rats. *Am J Hypertens*. 2001;14:1135-41.
- Miatello R, Risler N, Gonzalez S, Castro C, Ruttler M, Cruzado M. Effects of enalapril on the vascular wall in an experimental model of syndrome X. *Am J Hypertens*. 2002;15:872-8.
- Mitra P, Zheng X, Czech MP. RNAi-based analysis of CAP, Cbl, and CrkII function in the regulation of GLUT4 by insulin. *J Biol Chem*. 2004;279: 37431-5.

- Modan M, Halkin M, Almog S, Lusky A, Eshkil A, Shefi M, Shitrit A, Fuchs Z. Hyperinsulinemia: a link between hypertension, obesity and glucose intolerance. *J. Clin. Invest.* 1985;75: 809-17.
- Moller DE et Flier JS. Insulin resistance mechanisms, syndromes, and implications. *N Engl J Med.* 1991;325:938-48.
- Molloy CJ, Taylor DS, Weber H. Angiotensin II stimulation of rapid protein tyrosine phosphorylation and protein kinase activation in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1993;268:7338-45.
- Mombouli JV et Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. *Trends Pharmacol Sci.* 1997;18:252-6.
- Moncada S et Vane JR. Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood-vessel walls. *N Engl J Med.* 1979;300:1142-7.
- Moore RD. Effects of insulin upon ion transport. *Biochim Biophys Acta.* 1983;737: 1-49.
- Mori M, Sugo T, Abe M, Shimomura Y, Kurihara M, Kitada C, Kikuchi K, Shintani Y, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SENR (GPR14). *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;265:123-9.
- Murphy ME, Brayden JE. Apamin-sensitive K<sup>+</sup> channels mediate an endothelium-dependent hyperpolarization in rabbit mesenteric arteries. *J Physiol.* 1995;489:723-34.
- Mutafova-Yambolieva VN et Keef KD. Adenosine-induced hyperpolarization in guinea pig coronary artery involves A<sub>2b</sub> receptors and KATP channels. *Am J Physiol.* 1997;273:H2687-95.
- Nagakura A, Miyake-Takagi K, Takagi N, Fukui M, Takeo S. Impairment of adenylyl cyclase and of spatial memory function after microsphere embolism in rats. *J Neurosci Res.* 2002;68:363-72.
- Navarro-Cid, J, Maeso R, Vizcaino FP, Cachofeiro V, Ruilope LM, Tamargo J, and Lahera V. Effects of losartan on blood pressure, metabolic alterations, and vascular reactivity in the fructose-induced hypertensive rat. *Hypertension.* 1995;26:1074-8.
- Neubig RR, Spedding M, Kenakin T, Christopoulos A; International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol Rev.* 2003;55:597-606.

- Nicolau M, Feltrin MR, Regoli D. Induction of bradykinin B1 hypotensive receptors in rats by lipopolysaccharide. *Can J Physiol Pharmacol*. 1996;74:337-40.
- Nishiyama M, Moroi K, Shan LH, Yamamoto M, Takasaki C, Masaki T, Kimura S. Two different endothelin B receptor subtypes mediate contraction of the rabbit saphenous vein. *Jpn J Pharmacol*. 1995;68:235-43.
- O'Brien RM et Granner DK. Regulation of gene expression by insulin. *Physiol Rev*. 1996;76:1109-61.
- O'Brien SF, Russell JC, Davidge ST. Vascular wall dysfunction in JCR:LA-cp rats: effects of age and insulin resistance. *Am J Physiol*. 1999;277:C987-93.
- Odawara M, Kadowaki T, Yamamoto R, Shibasaki Y, Tobe K, Accili D, Bevins C, Mikami Y, Matsuura N, Akanuma Y, *et al*. Human diabetes associated with a mutation in the tyrosine kinase domain of the insulin receptor. *Science*. 1989;245:66-8.
- Oimomi M, Sakai M, Ohara T, Igaki N, Nakamichi T, Hata F, Baba S. Acceleration of fructose mediated collagen glycation. *J Int Med Res*. 1989;17:249-53.
- Olsson RA et Pearson JD. Cardiovascular purinoceptors. *Physiol Rev*. 1990;70:761-845.
- Peavy DE, Brunner MR, Duckworth WC, Hooker CS, Frank BH. Receptor binding and biological potency of several split forms (conversion intermediates) of human proinsulin. Studies in cultured IM-9 lymphocytes and in vivo and in vitro in rats. *J Biol Chem*. 1985;15;260:13989-94.
- Penn, RB, RA Panettieri Jr. et Benovic JL. 1998. Mechanisms of acute desensitization of the beta(2)AR-adenyl cyclase pathway in human airway smooth muscle. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 19: 338-48.
- Peraldi P et Spiegelman B. TNF-alpha and insulin resistance: summary and future prospects. *Mol Cell Biochem*. 1998;182:169-75.
- Pessin JE et Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action : molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000;106 :165-9.
- Petersson J, Zygmunt PM, Hogestatt ED. Characterization of the potassium channels involved in EDHF-mediated relaxation in cerebral arteries. *Br J Pharmacol*. 1997;120:1344-50.
- Pieper GM. Acute amelioration of diabetic endothelial dysfunction with a derivative of the nitric oxide synthase cofactor, tetrahydrobiopterin. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1997;29:8-15.

Pieper GM. Review of alterations in endothelial nitric oxide production in diabetes: protective role of arginine on endothelial dysfunction. *Hypertension*. 1998;31:1047-60.

Plane F, Wiley KE, Jeremy JY, Cohen RA, Garland CJ. Evidence that different mechanisms underlie smooth muscle relaxation to nitric oxide and nitric oxide donors in the rabbit isolated carotid artery. *Br J Pharmacol*. 1998;123:1351-8.

Pollock DM et Rekito A. Hypertensive response to chronic NO synthase inhibition is different in Sprague-Dawley rats from two suppliers. *Am J Physiol*. 1998;275:R1719-23.

Polonsky KS et Rubenstein AH. C-peptide as a measure of the secretion and hepatic extraction of insulin. Pitfalls and limitations. *Diabetes*. 1984;33:486-94.

Pryor WA et Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol*. 1995;268:L699-722.

Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest*. 1996;98:2572-9.

Reaven GM. Insulin resistance in noninsulin-dependant diabetes mellitus. Does it exist and can it be measured? *Am J Med*. 1983;74:3-17.

Reaven GM. Banting lecture : Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988;37:1595-1607.

Reaven GM, Ho H. Sugar-induced hypertension in Sprague-Dawley rats. *Am J Hypertens*. 1991;4:610-4.

Reaven GM. Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiol. Rev*. 1995;75:473-86.

Rees DD, Palmer RMJ, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*. 1990;101:746-52.

Regoli D et Barabé J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev*. 1980;32:1-46.

Regoli D, Gobeil F, Nguyen QT, Jukic D, Seoane PR, Salvino JM, Sawutz DG. Bradykinin receptor types and B2 subtypes. *Life Sci*. 1994;55:735-49.

Reynisdottir S, Ellerfeldt K, Wahrenberg H, Lithell H, Arner P. Multiple lipolysis defects in the insulin resistance (metabolic) syndrome. *J Clin Invest*. 1994a;93:2590-9.

- Reynisdottir S, Wahrenberg H, Carlstrom K, Rossner S, Arner P. Catecholamine resistance in fat cells of women with upper-body obesity due to decreased expression of beta 2-adrenoceptors. *Diabetologia*. 1994b;37:428-35.
- Rhaleb NE, Dion S, Barabé J, Rouissi N, Jukic D, Drapeau G, Regoli D. Receptors for kinins in isolated arterial vessels of dogs. *Eur J Pharmacol*. 1989;162:419-27.
- Richards AM, Nicholls MG, Lainchbury JG, Fisher S, Yandle TG. Plasma urotensin II in heart failure. *Lancet*. 2002;360:545-6.
- Richey JM, Si X, Halter JB, Webb RC. Fructose perfusion in rat mesenteric arteries impairs endothelium-dependent vasodilation. *Life Sci*. 1998;62:PL55-62.
- Rizzi A, Gobeil F, Calo G, Inamura N, Regoli D. FR 173657: a new, potent, nonpeptide kinin B2 receptor antagonist. An in vitro study. *Hypertension*. 1997;29:951-6.
- Rosenthal T, Erlich Y, Rosenmann E, Grossman E, Cohen A. Enalapril improves glucose tolerance in two rat models: a new hypertensive diabetic strain and a fructose-induced hyperinsulinaemic rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1995;22:S353-4.
- Rowe JW, Young JB, Minaker KL, Stevens AL, Pallotta J, Landsberg L. Effect of insulin and glucose infusions on sympathetic nervous system activity in normal man. *Diabetes*. 1981;30:219-25.
- Russell JC, Koeslag DG, Amy RM, Dolphin PJ. Plasma lipid secretion and clearance in hyperlipidemic JCR. LA-corpulent rats. *Arteriosclerosis*. 1989;9:869-76.
- Russell JC. Reduction and prevention of the cardiovascular sequelae of the insulin resistance syndrome. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 2001;1:107-20.
- Saad MF, Kahn SE, Nelson RG, Pettitt DJ, Knowler WC, Schwartz MW, Kowalyk S, Bennett PH, Porte D Jr. Disproportionately elevated proinsulin in Pima Indians with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990;70:1247-53.
- Sakamoto A, Yanagisawa M, Sakurai T, Takuwa Y, Yanagisawa H, Masaki T. Cloning and functional expression of human cDNA for the ETB endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;178:656-63.
- Sakamoto S, Minami K, Niwa Y, Ohnaka M, Nakaya Y, Mizuno A, Kuwajima M, Shima K. Effect of exercise training and food restriction on endothelium-dependent relaxation in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat, a model of spontaneous NIDDM. *Diabetes*. 1998;47:82-6.
- Saltiel AR et Pessin JE. Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol*. 2002;12:65-71.

Santur  M, Pitre M, Marette A, Deshaies Y, Lemieux C, Larivi re R, Nadeau A, Bachelard H. Induction of insulin resistance by high-sucrose feeding does not raise mean arterial blood pressure but impairs haemodynamic responses to insulin in rats. *Br J Pharmacol.* 2002;137:185-96.

Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res.* 1999;84:489-97.

Schroeder N, Mullmann T, Schmalhofer W, Gao Y, Garcia M, Giangiacomo K. Glycine 30 in iberiotoxin is a critical determinant of its specificity for maxi-K versus K(V) channels. *FEBS Lett.* 2002;527:298-302.

Schr r K. Blood vessel wall interactions in diabetes. *Diabetes.* 1997;46: S115-8.

Seamon KB, Daly JW, Metzger H, de Souza NJ, Reden J. Structure-activity relationships for activation of adenylate cyclase by the diterpene forskolin and its derivatives. *J Med Chem.* 1983;26:436-9.

Shafir E. Animal models of non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes Metab Rev.* 1992;8:179-208.

Shafir E et Gutman A. *Psammomys obesus* of the Jerusalem colony: a model for nutritionally induced, non-insulin-dependent diabetes. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 1993;4:83-99.

Sharma K, Wang L, Zhu Y, DeGuzman A, Cao GY, Lynn RB, Joseph SK. Renal type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is reduced in streptozotocin-induced diabetic rats and mice. *Am J Physiol.* 1999;276:F54-61.

Sleder J, Chen YD, Cully MD, Reaven GM. Hyperinsulinemia in fructose-induced hypertriglyceridemia in the rat. *Metabolism.* 1980;29:303-5.

Sowers JR, Standley PR, Ram JL, Jacober S, Simson L, Rose K. Hyperinsulinemia, insulin resistance and hyperglycemia: contributing factors in the pathogenesis of hypertension and atherosclerosis. *Am. J. Hypertens.* 1993;6:260S-70S.

Srinivas PR, Deutsch DD, Mathews ST, Goustin AS, Leon MA, Grunberger G. Recombinant human alpha 2-HS glycoprotein inhibits insulin-stimulated mitogenic pathway without affecting metabolic signalling in Chinese hamster ovary cells overexpressing the human insulin receptor. *Cell Signal.* 1996;8:567-73.

Stark AH, Timar B, Madar Z. Adaptation of Sprague Dawley rats to long-term feeding of high fat or high fructose diets. *Eur J Nutr.* 2000;39:229-34.



Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. *J Clin Invest*. 1996;97: 2601-2610.

Stekiel WJ, Contney SJ, Rusch NJ. Altered  $\beta$ -receptor control of in situ membrane potential in hypertensive rats. *Hypertension*. 1993;21:1005-9.

St-Pierre P, Bouffard L, Maheux P. Rosiglitazone increases extravasation of macromolecules and endothelial nitric oxide synthase in skeletal muscles of the fructose-fed rat model. *Biochem Pharmacol*. 2004;67:1997-2004.

Sudjarwo SA, Hori M, Tanaka T, Matsuda Y, Okada T, Karaki H. Subtypes of endothelin ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors mediating venous smooth muscle contraction. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;200:627-33.

Szabo C, Zingarelli B, O'Connor M, Salzman AL. DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci*. 1996;93:1753-8.

Takagawa Y, Berger ME, Hori MT, Tuck ML, Golub MS. Long-term fructose feeding impairs vascular relaxation in rat mesenteric arteries. *Am J Hypertens*. 2001;14:811-7.

Tay A, Ozcelikay AT, Altan VM. Effects of L-arginine on blood pressure and metabolic changes in fructose-hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 2002;15:72-7.

Thorburn AW, Storlien LH, Jenkins AB, Khouri S, Kraegen EW. Fructose-induced in vivo insulin resistance and elevated plasma triglyceride levels in rats. *Am J Clin Nutr*. 1989;49:1155-63.

Thornalley PJ, McLellan AC, Lo TW, Benn J, Sonksen PH. Negative association between erythrocyte reduced glutathione concentration and diabetic complications. *Clin Sci*. 1996;91:575-82.

Ting HH, Timimi FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest*. 1996;97:22-8.

Tobey TA, Mondon CE, Zavaroni I, Reaven GM. Mechanism of insulin resistance in fructose-fed rats. *Metabolism*. 1982;31:608-612.

Toblli JE, DeRosa G, Rivas C, Cao G, Piorno P, Pagano P, Forcada P. Cardiovascular protective role of a low-dose antihypertensive combination in obese Zucker rats. *J Hypertens*. 2003;21:611-20.

Togashi N, Ura N, Higashiura K, Murakami H, Shimamoto K. The contribution of skeletal muscle tumor necrosis factor-alpha to insulin resistance and hypertension in fructose-fed rats. *J Hypertens* 2000;18:1605-10.

Togashi N, Ura N, Higashiura K, Murakami H, Shimamoto K. Effect of TNF-alpha-converting enzyme inhibitor on insulin resistance in fructose-fed rats. *Hypertension*. 2002;39:578-80.

Tomiya H, Kushiro T, Abeta H, Ishii T, Takahashi A, Furukawa L, Asagami T, Hino T, Saito F, Otsuka Y, *et al.* Kinins contribute to the improvement of insulin sensitivity during treatment with angiotensin converting enzyme inhibitor. *Hypertension*. 1994;23:450-5.

Touyz RM et Berry C. Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res*. 2002;35:1001-15.

Touyz RM et Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev*. 2000;52:639-72.

Thresher JS, Podolin DA, Wei Y, Mazzeo RS, Pagliassotti MJ. Comparison of the effects of sucrose and fructose on insulin action and glucose tolerance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000;279:R1334-40.

Triggle CR, Dong H, Waldron GJ, Cole WC. Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): species and tissue heterogeneity. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1999;26:176-9.

Tschop M et Heiman ML. Rodent obesity models: an overview. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2001;109:307-19.

Turner NC et Clapham JC. Insulin resistance, impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes, pathologic mechanisms and treatment: current status and therapeutic possibilities. *Prog Drug Res*. 1998;51:33-94.

Ura N, Higashiura K, Shimamoto K. The mechanisms of insulin sensitivity improving effects of angiotensin converting enzyme inhibitor. *Immunopharmacology*. 1999;44:153-9.

Ushio-Fukai M, Griending KK, Akers M, Lyons PR, Alexander RW. Temporal dispersion of activation of phospholipase C-beta1 and -gamma isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of alphaq/11, alpha12, and beta gamma G protein subunits. *J Biol Chem*. 1998;273:19772-7.

van Helden DF et Woolridge S. Role of nerves in hypertension. *Nature*. 1990;348:118-9.

Vanhoutte PM. Endothelium and control of cardiovascular function. *Hypertension*. 1989;13:658-67.

Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction and inhibition of converting enzyme. *Eur Heart J*. 1998;19:J7-J15.

van Oostrom AJ, Cabezas MC, Rabelink TJ. Insulin resistance and vessel endothelial function. *J R Soc Med*. 2002;95:54-61.

Vargas HM, Cuervas JM, Ignarro LJ, Chaudhuri G. Comparison of the inhibitory potencies of N<sup>G</sup>-methyl-, N<sup>G</sup>-nitro- and N<sup>G</sup>-amino-L-arginine on EDRF function in the rat: evidence for continuous basal EDRF release. *J Pharmacol Exp Ther*. 1991;257:1208-15.

Vasdev S, Ford CA, Longerich L, Gadag V, Wadhawan S. Role of aldehydes in fructose induced hypertension. *Mol Cell Biochem*. 1998;181:1-9.

Vergara C, Latorre R, Marrion NV, Adelman JP. Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol*. 1998;8:321-9.

Verma S, Bhanot S, McNeill JH. Antihypertensive effects of metformin in fructose-fed hyperinsulinemic, hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994;271:1334-7.

Verma S, Bhanot S, Yao L, McNeill JH. Defective endothelium-dependent relaxation in fructose-hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 1996;9:370-376.

Verma S, Skarsgard P, Bhanot S, Yao L, Laher I, McNeill JH. Reactivity of mesenteric arteries from fructose hypertensive rats to endothelin-1. *Am J Hypertens*. 1997;10:1010-19.

Vlassara H, Fuh H, Makita Z, Krungkrai S, Cerami A, Bucala R. Exogenous advanced glycosylation end products induce complex vascular dysfunction in normal animals: a model for diabetic and aging complications. *Proc Natl Acad Sci*. 1992;89:12043-7.

Vydelingum S, Shillabeer G, Hatch G, Russell JC, Lau DCW. Overexpression of the obese gene in the genetically obese JCR. LA-cp rat. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;216:148-53.

Waldron GJ, Ding H, Lovren F, Kubes P, Triggle CR. Acetylcholine-induced relaxation of peripheral arteries isolated from mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol*. 1999;128:653-8.

Wang Z, Wu L, Wang R. Kinin B2 receptor-mediated contraction of tail arteries from normal or streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol*. 1998;125:143-51.

Watts GF, O'Brien SF, Silvester W, Millar JA. Impaired endothelium-dependent and independent dilatation of forearm resistance arteries in men with diet-treated non-insulin-dependent diabetes: role of dyslipidaemia. *Clin Sci*. 1996;91:567-73.

Way KJ, Katai N, King GL. Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications. *Diabet Med*. 2001;18:945-59.

White MF et Kahn RC. The insulin signaling system. *J Biol Chem*. 1994;269:1-4.

White MF. The IRS-signalling systems: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem*. 1998;182:3-11.

Wiese RJ, Mastick CC, Lazar DF, Saltiel AR. Activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3'-kinase is not sufficient for the hormonal stimulation of glucose uptake, lipogenesis, or glycogen synthesis in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*. 1995;270:3442-6.

Williams SB, Cusco JA, Roddy MA, Johnstone MT, Creager MA. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*. 1996;27:567-74.

Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*. 1998;391:900-4.

Wright JW et Harding JW. Important role for angiotensin III and IV in the brain renin-angiotensin system. *Brain Res Brain Res Rev*. 1997;25:96-124.

Wu-Peng XS, Chua SC Jr, Okada N, Liu S-M, Nicolson M, Leibel RL. Phenotype of the obese Koletsky (f) rat due to Tyr763Stop mutation in the extracellular domain of the leptin receptor (Lepr). *Diabetes*. 1997;46: 513-8.

Wu-Wong JR, Berg CE, Wang J, Chiou WJ, Fissel B. Endothelin stimulates glucose uptake and GLUT4 translocation via activation of endothelin ETA receptor in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*. 1999;274:8103-10.

Yagi N, Takasu N, Higa S, Ishikawa K, Murakami K, Mimura G. Effect of troglitazone, a new oral antidiabetic agent, on fructose-induced insulin resistance. *Horm Metab Res*. 1995;27:439-41.

Yalow RS et Berson RA. Plasma insulin concentration in nondiabetics and early diabetic subjects. *Diabetes*. 1960;9:254-60.

Yanagisawa M, Inoue A, Ishikawa T, Kasuya Y, Kimura S, Kumagaye S, Nakajima K, Watanabe TX, Sakakibara S, Goto K, *et al*. Primary structure, synthesis, and biological

activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Proc Natl Acad Sci.* 1988;85:6964-7.

Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of IKK $\beta$ . *Science.* 2001;293:1673-7.

Zavaroni I, Chen YDI, Reaven GM. Studies of the mechanism of fructose-induced hypertriglyceridemia in the rat. *Metabolism.* 1982;31:1077-83.

Zeng G, Quon MJ. Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* 1996;98:894-8.

Zhang X et Hintze TH. cAMP signal transduction cascade, a novel pathway for the regulation of endothelial nitric oxide production in coronary blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:797-803.